



UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE CARTAGENA

**ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIERÍA
AGRONÓMICA**

DEPARTAMENTO DE PRODUCCIÓN VEGETAL

INGENIERO AGRÓNOMO

PROYECTO FIN DE CARRERA:

**“AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE LOS RIZOBIOS
ASOCIADOS A LOS NÓDULOS DE *ASTRAGALUS
NITIDIFLORUS*”.**

Realizado por:
Noelia Real Giménez

Dirigido por:
María José Vicente Colomer
Francisco José Segura Carreras

Cartagena, Julio de 2014.

ÍNDICE GENERAL

1. Introducción.....	1
1.1. <i>Astragalus nitidiflorus</i>.....	2
1.1.1. Encuadre taxonómico.....	2
1.1.2. El origen de <i>Astragalus nitidiflorus</i>	4
1.1.3. Descripción de la especie.....	5
1.1.4. Biología.....	7
1.1.4.1. Ciclo vegetativo.....	7
1.1.4.2. Fenología de la floración.....	9
1.1.4.3. Sistema de reproducción.....	10
1.1.4.4. Dispersión de los frutos.....	11
1.1.4.5. Nodulación con <i>Rhizobium</i>	12
1.1.4.6. Diversidad genética.....	13
1.1.5. Ecología.....	14
1.1.6. Corología y tamaño poblacional.....	15
1.1.7. Protección.....	18
1.1.8. Amenazas.....	19
1.1.8.1. Factores bióticos.....	19
1.1.8.2. Factores abióticos.....	20
1.1.8.3. Factores antrópicos.....	21
1.2. Los rizobios.....	25
1.2.1. Origen del estudio y taxonomía.....	25
1.2.2. Establecimiento de la relación simbiótica entre la leguminosa y el rizobio.....	28
1.2.2.1. Iniciación del nódulo.....	28
1.2.2.1.1. Señalización entre la planta y <i>Rhizobium</i>	28
1.2.2.1.2. Invasión y formación del canal de infección.....	29
1.2.2.1.3. Estructura y desarrollo de los nódulos.....	31
1.2.3. La fijación biológica de nitrógeno al desarrollo de inoculantes microbianos.....	34
1.2.3.1. Información general sobre la fijación del nitrógeno.....	34
1.2.3.2. El ciclo del nitrógeno y la fijación de N ₂ atmosférico.....	35
1.2.4. Los rizobios que nodulan con " <i>Astragalus</i> ".....	37
1.2.4.1. Características del género <i>Rhizobium</i>	37
1.2.4.1.1. <i>Rhizobium giardini</i>	38
1.2.5. Importancia de la biodiversidad y estudio de los rizobios.....	38
1.3. Inoculación de plantas en viveros.....	40
1.3.1. Introducción.....	40
1.3.2. Estudios de biodiversidad y caracterización de rizobios.....	42
1.3.2.1. Marcadores moleculares: <i>inter simple sequence repeats</i> (ISSRs).....	43
1.3.2.1.1. Fundamento de la PCR.....	45
1.3.2.2. Secuenciación del ARNr 16S.....	46
1.3.3. Marco legal y comercialización de los inoculantes en el mundo.....	52
1.3.4. Marco legal de los inoculantes en España.....	53

1.3.5. Tendencias en la investigación y el desarrollo de inoculante.....	54
2. Objetivos.....	56
3. Material y métodos.....	59
3.1. Material vegetal.....	60
3.2. Método.....	60
3.2.1. Aislamiento.....	61
3.2.1.1. Desinfección de nódulos.....	61
3.2.1.2. Crecimiento de colonias en medio EL-MARC.....	62
3.2.1.3. Crecimiento de colonias en medio Mc-Conckey.....	64
3.2.1.4. Crecimiento de colonias en medio Kligler.....	65
3.2.1.5. Crecimiento de colonias en medio LMA + Azul Bromotimol.....	67
3.2.2. Identificación.....	67
3.2.2.1. Extracción ADN bacterial.....	67
3.2.2.2. Amplificación del fragmento perteneciente a la región 16S, nodA y nodC mediante empleo de la PCR.....	69
3.2.2.3. Electroforesis del ADN.....	71
3.2.2.4. Purificación del fragmento amplificado.....	72
3.2.2.5. Secuenciando del fragmento amplificado.....	73
3.2.2.6. Introducción de la secuencia en la base de datos BLAST.....	74
3.2.3. Inoculación.....	75
3.2.3.1. Desinfección de semillas.....	75
3.2.3.2. Escarificación y germinación de semillas.....	75
3.2.3.3. Desinfección de turba.....	75
3.2.3.4. Preparación del inóculo.....	75
3.2.3.5. Inoculación.....	76
4. Resultados.....	77
4.1. Aislamiento.....	78
4.1.1. Crecimiento de colonias en medio EL-MARC.....	78
4.1.2. Crecimiento de colonias en medio McConkey.....	79
4.1.3. Crecimiento de colonias en medio Kligler.....	80
4.1.4. Crecimiento de colonias en medio LMA+Azul Bromotimol.....	81
4.2. Identificación.....	83
4.3. Inoculación.....	87
5. Conclusión.....	88
6. Referencia bibliográficas.....	90

ÍNDICE DE IMÁGENES

Imagen 1. (Izq.)Planta de <i>Astragalus nitidifloru</i> sen periodo de floración; (Der.) Planta de <i>Astragalus nitidiflorus</i> , de 30-40 cm de diámetro, en su segundo año de vida. A los cuatro años puede llegar a alcanzar hasta un metro de diámetro	4
Imagen 2. Las hojas de <i>Astragalus nitidiflorus</i> son imparipinnadas, con 8-12 pares de folíolos vilosos por ambas caras	5
Imagen 3. Inflorescencia de <i>Astragalus nitidiflorus</i> en la que puede observarse la característica corola papilionácea de las <i>Fabáceas</i> con 5 pétalos libres; 1 superior muy desarrollado, denominado estandarte, 2 laterales o alas y 2 inferiores que pueden estar soldados y forman la quilla	6
Imagen 4. (Izq.) Frutos de <i>Astragalus nitidiflorus</i> ; y (Der.) Semilla reniforme de <i>Astragalus nitidiflorus</i>	7
Imagen 5. Detalle de frutos y semillas de <i>Astragalus nitidiflorus</i> . Los frutos de esta especie contienen por término medio unas doce semillas	7
Imagen 6. Tras el reposo estival, se produce el rebrote de las yemas situadas en la base de los tallos, a ras del suelo. De esta forma comienza la planta un nuevo periodo de actividad vegetativa	8
Imagen 7. Esquema del ciclo de <i>Astragalus nitidiflorus</i> durante tres años, aunque se ha comprobado que puede vivir al menos hasta cinco años en el medio natural	8
Imagen 8. En su primer año de vida las plántulas de <i>Astragalus nitidiflorus</i> desarrollan tan sólo 4-5 hojas. En su segundo año de vida y con mayor desarrollo vegetativo florecen por primera vez, dando lugar por término medio a 100 flores por planta	9
Imagen 9. Durante el periodo de floración, las inflorescencias se van sucediendo en los tallos conforme estos van creciendo. El número de inflorescencias producidas varía en función de la edad de la planta	9
Imagen 10. Tras la fecundación de las flores se desprenden los pétalos marchitos y comienza el cuajado de los frutos	10
Imagen 11. Las flores de <i>Astragalus nitidiflorus</i> son polinizadas por abejas del género <i>Osmia</i> , también conocidas como “abejas albañiles” por construir sus nidos y celdas con barro	10
Imagen 12. Detalle de una abeja albañil posada sobre un piroclasto originado en el afloramiento volcánico de los Pérez Bajos	11

Imagen 13. Los frutos al madurar en verano se desprenden y quedan debajo de los tallos secos de la planta madre. Cuando la planta rebrota los frutos quedan bajo su sombra.....	11
Imagen 14. Germinación de semillas de <i>Astragalus nitidiflorus</i> sobre papel de filtro en placas de Petri.....	12
Imagen 15. Detalle de la germinación de semillas de <i>Astragalus nitidiflorus</i> donde se observa la emergencia de la radícula.....	12
Imagen 16. Nódulos de <i>Rhizobium giardinii</i> que se han desarrollado en plantas de <i>Astragalus nitidiflorus</i> cultivadas en maceta con mezcla de turba y suelo del hábitat.....	13
Imagen 17. Hábitat natural de <i>Astragalus nitidiflorus</i> . Las plantas del Garbancillo se encuentran sobre terrenos volcánicos de naturaleza basáltica, alterados por la actividad humana.....	14
Imagen 18. Ejemplar de <i>Astragalus nitidiflorus</i> sobre basaltos alcalinos volcánicos.....	14
Imagen 19. Cabezo Negro de Tallante, volcán extinguido que constituye el último episodio de vulcanismo del sureste español hace 2,6 millones de años.....	15
Imagen 20. Localización de las subpoblaciones existentes de <i>Astragalus nitidiflorus</i> en el complejo de Cabezos del Pericón.....	17
Imagen 21. Hembra de <i>Bruchophagus astragali</i>	20
Imagen 22. La proporción de flores que se convierten en frutos es muy baja, apenas alcanza el 20%, lo que da lugar a una media de 4-5 frutos por inflorescencia.....	21
Imagen 23. Germinación de semillas del Garbancillo en el interior del fruto.....	21
Imagen 24. Cultivo de almendros, representativos del entorno asociado al Garbancillo de Tallante.....	22
Imagen 25. Ladera de un cabezo volcánico colonizada por arbustos de baja talla. Estas plantas son propias de etapas de sucesión ecológica más avanzada.....	23
Imagen 26. Pastor con su rebaño, como muestra de las actividades tradicionales del entorno.....	23
Imagen 27. Localización de la población de <i>Astragalus nitidiflorus</i> en la Región de Murcia (Sánchez <i>et al.</i> , 2004).....	24
Imagen 28. Distribución de <i>Astragalus nitidiflorus</i> en cuadrícula UTM de 0,25 km 2 (Dirección General del Medio Natural, 2004).....	24

Imagen 29. Modelo esquemático, mostrando la colonización (A) y la deformación del pelo radicular y formación del canal de infección (B) por <i>Rhizobium</i>	29
Imagen 30. Dinámica de formación de un nódulo en la raíz en una leguminosa causado por <i>Rhizobium</i>	30
Imagen 31. Esquema de las fases iniciales de la formación del nódulo (A): inducción del ciclo celular en células del córtex (flecha); (B): progresión y ramificación del canal de infección en las células recién formadas.....	31
Imagen 32. Morfología de un nódulo indeterminado de <i>Medicago truncatula</i> y de un nódulo determinado de <i>Lotus japonicus</i> (Buchanan et al. 2000).....	32
Imagen 33. Tipos de Nódulos.....	33
Imagen 34 .Funcionamiento del complejo de la nitrogenasa (Taiz & Zeiger, 2006)	34
Imagen 35. Ciclo del nitrógeno (MEC, 2008).....	36
Imagen 36. PCR de los ISSRs: representación esquemática de un solo primer (AG)8 anclado en la terminación 3' con dos nucleótidos (NN), alineado en regiones específicas del ADN templado produciendo bandas claras.....	44
Imagen 37. Fases de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	45
Imagen 38. Etapas a seguir en el proceso de identificación bacteriana mediante secuenciación del ADNr 16S.....	48
Imagen 39. El operón ribosómico (rmn).....	49
Imagen 40. Electroforesis en gel poliacrilamida.....	51
Imagen 41. Separación de DNA en gel de agarosa, electroforesis horizontal submarina.....	51
Imagen 42. Distribución geográfica de la población de estudio.....	60
Imagen 43. (Der.) Planta de <i>Astragalus nitidiflorus</i> , (Med.) Limpieza de la parte radicular de la planta, (Izq.) Desinfección de los nódulos.....	61
Imagen 44. Nódulos de <i>Astragalus nitidiflorus</i> desinfectados.....	62
Imagen 45. (Izq.) Realización de la siembra por estría de un nódulo; (Der.) Una placa Petri después de realizar la siembra por estría.....	63
Imagen 46. (Izq.) Placa Petri con positivo en colonia de rizobio; (Der.) Siembra por agotamiento del <i>Rhizobium</i>	63

Imagen 47. Placas petri con el medio McConckey.....	64
Imagen 48. Procedimiento de siembra por estría en tubos de ensayo.....	65
Imagen 49. Tipos de reacciones producidas por las bacterias que crecen en agar hierro de Kligler.....	66
Imagen 50. Tubos de ensayo con la preparación de crecimiento de colonias en medio LMA + Azul de Bromotimol.....	67
Imagen 51. Extracción del ADN genómico.....	69
Imagen 52. Protocolo de amplificación del ADN ribosomal 16S, método de la polimerasa en cadena "PCR.....	71
Imagen 53. Protocolo preparación del gel de agarosa al 1,5%.....	72
Imagen 54. Purificación del fragmento amplificado.....	73
Imagen 55. Secuenciador.....	73
Imagen 56. BLAST (Basic Local Alignment Search Tool).....	74
Imagen 57. (Izq.) Pipetado 10 ml de ELM para colocar en los tubos de ensayo; (Der.) Recorte de 1x1 cm de cultivo de <i>Rhizobium</i> e introduciéndolo en los tubos con el cultivo ELM.....	76
Imagen 58. Inoculación de <i>Rhizobium</i> en una bandeja de cultivo forestal de <i>Astragalus nitidiflorus</i>	76
Imagen 59. Resultados del crecimiento de colonias en el medio EL-MARC.....	78
Imagen 60. Placas petri después de la incubación con el medio McConckey.....	79
Imagen 61. Tubos de ensayo después de la incubación del crecimiento de colonias en medio Kligler.....	80
Imagen 62. Tubos de ensayo después de la incubación del crecimiento de colonias en medio LMA + Azul de Bromotimol.....	81
Imagen 63. Gráfica de porcentaje de especies.....	86

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación científica de la especie <i>Astragalus nitidiflorus</i>	3
Tabla 2. Clasificación taxonómica de los rizobios: (#: no rizobios con capacidad de nodular en simbiosis con leguminosas; *: especies sin capacidad de nodulación descrita en los rizobios) (Rivas et al., 2009).....	26
Tabla 3. Clasificación científica de la especie <i>Rhizobium giardinii</i>	38
Tabla 4. Reactivos empleados en la PCR.....	70
Tabla 5. Cebadores para la amplificación de ADN.....	70
Tabla 6. Condiciones de tiempo y temperatura de PCR.....	70
Tabla 7. Resultado de crecimiento bacteriano en los diferentes medios de cultivo.....	77
Tabla 8. Resultados de identificación de los nódulos de la planta 1.....	78
Tabla 9. Resultados de identificación de los nódulos de la planta 2.....	79
Tabla 10. Resultado global de identificación de los nódulos de estudio.....	79

1. INTRODUCCIÓN

1.1. *Astragalus nitidiflorus*

1.1.1. Encuadre taxonómico.

La especie *Astragalus nitidiflorus* Jiménez Mun. & Pau, conocida comúnmente como Garbancillo de Tallante, pertenece a la familia Fabaceae (=Leguminosae), y al orden Fabales.

La familia Fabaceae comprende un gran número de géneros de plantas angiospermas, tanto de porte leñoso, como arbustivo y herbáceo, anuales, bienales o perennes, que se agrupan en tres subfamilias: Caesalpinioideae, Mimosoideae y Faboideae o Papilionoideae. Además de estas subfamilias, la familia de las leguminosas también incluye dos tribus Cercideae, Detarieae y el género *Duparquetia*. Esta familia comprende unos 750 géneros y entre 16000 y 19000 especies, distribuidas por todo el mundo, siendo la segunda familia en importancia económica tras la Gramineae y en número sólo superada por las Compositae y la Orchidaceae (Allen & Allen, 1981).

Una característica común a todas las leguminosas es su fruto, una legumbre con diversas modificaciones cuya función es la dispersión de la semilla, ya sea independientemente o asociada a animales, agua o viento. Una característica general de la familia Leguminosae es su capacidad para establecer una relación simbiótica con bacterias del suelo denominadas rizobios, que se traduce en un intercambio de sustancias nutritivas. La bacteria, una vez desarrollados los nódulos radiculares en las plantas, está en condiciones de tomar nitrógeno (N₂) atmosférico y fijarlo en forma de aminoácidos, mientras que la planta puede nutrir con carbohidratos a la bacteria en el nódulo (Castrovejo *et al.*, 1986).

La subfamilia Faboideae es la que más géneros y especies aporta a la familia de las leguminosas y se encuentra distribuida por prácticamente todas las zonas del planeta. Esta subfamilia contiene especies leñosas, más frecuente en zonas cálidas, y especies herbáceas, que se distribuyen por todos los territorios. La característica común de esta subfamilia es la flor, con forma de mariposa, de ahí el nombre alternativo de *Papilionoideae*. La flor está compuesta de cinco pétalos, el más representativo el estandarte, que sobresale superiormente a los cuatro. De estos cuatro los inferiores a veces están unidos, cerrando los estambres y el estilo. Las hojas suelen contener varios foliolos, más de tres, y la vaina suele ser bivalva y dehiscente, con una gran variedad de formas (Castrovejo *et al.*, 1986).

El género *Astragalus* es considerado el más rico dentro de las leguminosas (Gómez-Sosa, 1979) y el más numeroso de las plantas con flor. Se estima que lo conforman entre 2500 y 3000 especies (Podlech, 1986; Lock y Simpson, 1991) que se distribuye en regiones frías y áridas de casi todo el mundo, exceptuando Australia y Nueva Zelanda (Gómez-Sosa, 1979). En Norteamérica se estiman 400 a 450 especies y en los Andes de Sudamérica hay aproximadamente 100, pero es especialmente diverso en Asia con 1000 a 1500 especies (Wojciechowski et al., 1999).

Las especies de *Astragalus* son comúnmente conocidas como "hierba loca", "chinchines" o "sonadoras" (Rzedowski y Rzedowski, 2001). Varias especies del género se han utilizado desde la antigüedad en la medicina tradicional china, en la cual se receta la raíz y se ha probado que ésta tiene compuestos que funcionan como inmunoestimulantes, hepatoprotectores, diuréticos, antiabéticos, analgésicos, expectorantes y sedanes. El estudio de las propiedades farmacológicas y su aplicación clínica no había sido abordado hasta recientemente (Dong et al., 2003).

Las especies patagónicas son utilizadas como forraje antes de la producción de frutos, porque una vez que maduran las semillas se vuelven peligrosas por el alto grado de compuestos tóxicos que presenta su testa (Gómez-Sosa, 1979). Se ha estudiado la toxicidad de los nitrocompuestos que tienen los *Astragalus* y se detectó que los rumiantes son particularmente sensibles a éstos, pero el grado de toxicidad depende de la cantidad consumida y la composición de los nitrocatalizadores absorbidos a nivel de sistema digestivo (William y James, 1975).

Tabla 1. Clasificación científica de la especie *Astragalus nitidiflorus*.

CLASIFICACIÓN CIENTÍFICA	
Reino:	<i>Plantae</i>
Phylum:	<i>Spermatophyta</i>
Clase:	<i>Dicotyledoneae</i>
Orden:	<i>Fabales</i>
Familia:	<i>Fabaceae</i>
Subfamilia:	<i>Faboideae</i>
Tribu:	<i>Astragaleae</i>
Subtribu:	<i>Astragalinae</i>
Género:	<i>Astragalus</i>
Especie:	<i>Astragalus nitidiflorus</i>

1.1.2. El origen de *Astragalus nitidiflorus*

En 1910 se cita por primera vez el *Astragalus nitidiflorus* por los botánicos Francisco de Paula Jiménez Munuera y Carlos Pau en el Boletín de la Sociedad Aragonesa de Ciencias Naturales, a partir de una recolección de F. de P. Jiménez Munuera llevada a cabo en 1909 en Cartagena. Desde esa fecha sólo se conocía el pliego de herbario que los autores depositaron en el Real Jardín Botánico de Madrid.

En el año 2000 aparece la especie catalogada como “Extinta” en la Lista Roja 2000 de la Flora Vascular Española (VV.AA., 2000).



Imagen 1. (Izq.)Planta de *Astragalus nitidiflorus* en periodo de floración; (Der.) Planta de *Astragalus nitidiflorus*, de 30-40 cm de diámetro, en su segundo año de vida. A los cuatro años puede llegar a alcanzar hasta un metro de diámetro.

En 2003 aparece en el Libro Rojo de la Flora Silvestre Protegida de la Región de Murcia en la categoría “De Interés Especial”, y en ese mismo año se incluye en el Atlas y Libro Rojo de la Flora Vascular Amenazada de España. Taxones prioritarios en la categoría de Extinta (Galicia y Sánchez-Gómez, 2003).

En 2004 fue redescubierta por Sergio Martínez Mendoza, encontrando un único ejemplar en el Cordel de Perín (Pérez Bajos). A partir de ese momento se inician varias campañas de búsqueda del taxón por esta zona, encontrándose ese año 46 ejemplares en los alrededores de Pérez Bajos. Ese mismo año vuelve a publicarse el Atlas y Libro Rojo de la Flora Vascular Amenazada de España, apareciendo el taxón en la categoría “En Peligro Crítico” (Sánchez *et al.*, 2004).

En el año 2005 se incluye en el Catálogo Nacional de Especies Amenazadas con la categoría “En Peligro de Extinción” (Orden MAM/2331/2005).

En el 2008 se publica la Lista Roja de La Flora Vascular Española (Moreno, 2008) apareciendo el taxón como “En Peligro Crítico”.

En el 2011 se publica el Real Decreto 139/2011 para el desarrollo del Listado de Especies Silvestres en Régimen de Protección Especial y del Catálogo Español de Especies Amenazadas y se incluye el taxón como En Peligro de Extinción.

En junio de 2012 la Comisión Europea concede a la Universidad Politécnica de Cartagena, en colaboración con la Comunidad Autónoma y el Ayuntamiento de Cartagena, un proyecto LIFE+ para la conservación de *Astragalus nitidiflorus* en su área potencial de la Región de Murcia (proyecto LIFE11 BIO/ES/727).

1.1.3. Descripción de la especie

Astragalus nitidiflorus es una hierba perenne, inerme, con base leñosa de la que salen varios tallos. Tallos de hasta 80 cm, procumbentes o ascendentes, hasta de unos 2,5 a 3,5 mm de diámetro en la zona media, con denso indumento blanquecino formado por pelos de 2 a 3 mm, basifijos, blancos o blancos y negros cerca de los nudos de las hojas. Hojas de hasta 14 cm, pecioladas, imparipinnadas, con unos 10 a 12 pares de folíolos elípticos o ligeramente truncados en el ápice, de hasta 20 x 9 mm, vilosos por ambas caras, con los pelos más esparcidos por el haz; estípulas de 11 a 15 mm, soldadas a la base del pecíolo, soldadas entre sí casi hasta su mitad, verdes.



Imagen 2. Las hojas de *Astragalus nitidiflorus* son imparipinnadas, con 8-12 pares de folíolos vilosos por ambas caras.

La inflorescencia es un racimo denso con 20 a 25 flores, bracteado, con pedúnculos de hasta 6,5 cm, rectos, con indumento parecido al del tallo; brácteas 6-9 x 3-3,5 mm, lanceoladas, de haz glabra y envés viloso; pedicelos 2-3 mm en la fructificación.

Cáliz 11-12 mm, con pelos poco densos, negros y blancos; dientes 4,5-6 mm, algo más largos que el tubo. Corola de hasta 2,1 cm; estandarte amarillo pálido, casi dos veces la longitud del cáliz, estrechamente rómbico, bilocado; quilla y alas amarillo-verdosas, mucho más cortas que el estandarte. Androceo con 10 estambres.



Imagen 3. Inflorescencia de *Astragalus nitidiflorus* en la que puede observarse la característica corola papilionácea de las *Fabáceas* con 5 pétalos libres; 1 superior muy desarrollado, denominado estandarte, 2 laterales o alas y 2 inferiores que pueden estar soldados y forman la quilla.

El fruto de unos 13 a 18 mm de longitud y de anchura dorsiventral unos 5 a 7 mm, subsentado, septado, navicular, estrechamente oblogoindal, curvo, aquillado en el vientre; valvas convexas, rígidas, casi pétreas, tuberculadas o mamelonadas, glabrescentes cuando son muy viejas. Las semillas unos 3 mm, reniformes, con caras y dorso convexos, de superficie reticulado-alveolada, amarillentas o pardas (Real Jardín Botánico, 1999; Sánchez Gómez *et al.*, 2004).



Imagen 4. (Izq.) Frutos de *Astragalus nitidiflorus*; y (Der.) Semilla reniforme de *Astragalus nitidiflorus*.



Imagen 5. Detalle de frutos y semillas de *Astragalus nitidiflorus*. Los frutos de esta especie contienen por término medio unas doce semillas.

1.1.4. Biología

1.1.4.1. Ciclo vegetativo

Astragalus nitidiflorus es una hierba perenne que no suele sobrepasar los cuatro o cinco años de vida. Se reproduce por semilla, observándose la germinación en los meses de otoño e invierno (hasta febrero o marzo). Las plántulas se pueden desarrollar hasta la época estival si las lluvias son propicias. En verano, por falta de humedad, las hojas se secan y las plantas juveniles permanecen en reposo, subsistiendo algunas yemas en la base de los tallos, a ras del suelo (comportamiento de hemicriptófito). Tras las lluvias otoñales, las plantas que han sobrevivido al verano rebrotan y comienzan un segundo periodo vegetativo que da lugar a la primera floración en primavera (Martínez-Sánchez *et al.*, 2007).



Imagen 6. Tras el reposo estival, se produce el rebrote de las yemas situadas en la base de los tallos, a ras del suelo. De esta forma comienza la planta un nuevo periodo de actividad vegetativa.

Después de un nuevo periodo de reposo estival volverán a rebrotar para volver a florecer en la siguiente primavera, sucediéndose así su ciclo vital hasta un máximo de cuatro o cinco años.

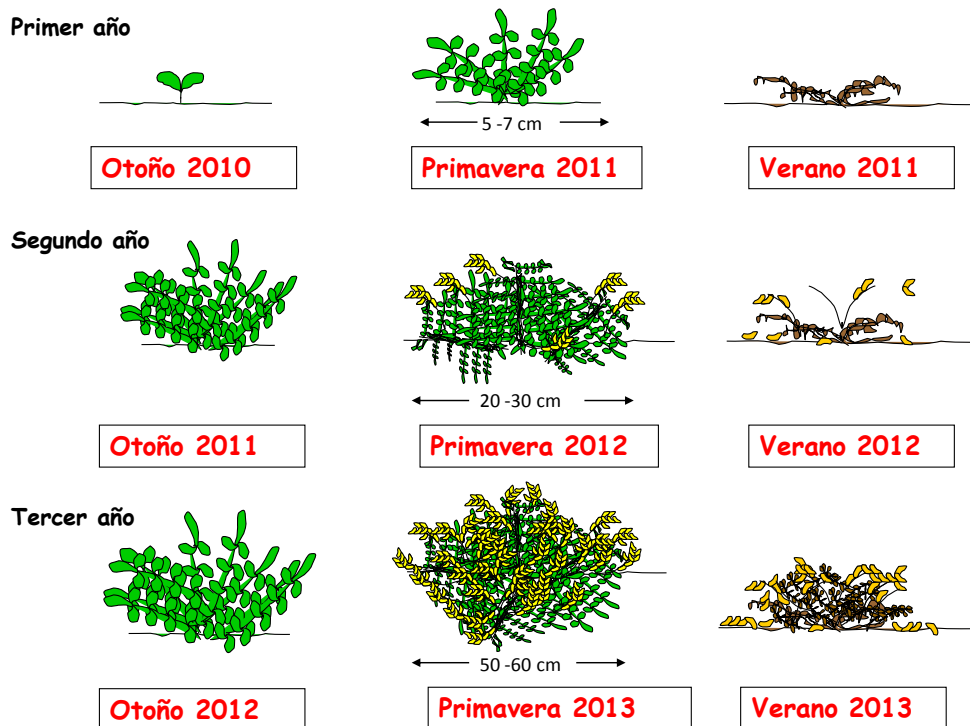


Imagen 7. Esquema del ciclo de *Astragalus nitidiflorus* durante tres años, aunque se ha comprobado que puede vivir al menos hasta cinco años en el medio natural.

La etapa más vulnerable del ciclo de vida de la especie es la de plántula (primer año de vida), puesto que se ha demostrado que algunos años ni una sola de estas plántulas es capaz de sobrevivir al primer verano, y, en el mejor de los casos estudiados, no sobreviven más del 30% de ellas (Martínez-Sánchez *et al.*, 2011).



Imagen 8. En su primer año de vida las plántulas de *Astragalus nitidiflorus* desarrollan tan sólo 4-5 hojas. En su segundo año de vida y con mayor desarrollo vegetativo florecen por primera vez, dando lugar por término medio a 100 flores por planta.

1.1.4.2. Fenología de la floración

Se trata de una planta de floración primaveral. De forma general se puede decir que la especie comienza su floración en marzo y la termina a finales del mes de abril o principios de mayo, dependiendo de las condiciones climáticas. Las inflorescencias emergen de las axilas de las hojas terminales, que se van sucediendo en el tallo conforme este va creciendo. Estas inflorescencias suelen tener por término medio unas 20 flores, las cuales van dando lugar a los frutos, algunos de los cuales se podrán ver maduros ya desde principios de mayo.



Imagen 9. Durante el periodo de floración, las inflorescencias se van sucediendo en los tallos conforme estos van creciendo. El número de inflorescencias producidas varía en función de la edad de la planta.

Se ha observado un bajo cuajado de flores (algo más de un 80% de las flores abortan), pero la intensa floración de los ejemplares adultos permite una elevada producción de semillas a lo largo de toda la vida del individuo (se han estimado producciones de algo más de 20000 semillas en un único individuo, Martínez-Sánchez *et al.*, 2011).



Imagen 10. Tras la fecundación de las flores se desprenden los pétalos marchitos y comienza el cuajado de los frutos.

1.1.4.3. Sistema de reproducción

Estudios llevados a cabo sobre el sistema de cruzamiento de la especie apuntan a que *Astragalus nitidiflorus* se comporta como xenógama facultativa, es decir las plantas se reproducen comúnmente por fecundación cruzada pero la autogamia también puede ocurrir. Las observaciones de campo han puesto de manifiesto que las flores son visitadas por himenópteros, como *Osmia tricornis* Latreille, 1811 y *Apis mellifera* Linnaeus, 1758 (Vicente *et al.*, 2011).



Imagen 11. Las flores de *Astragalus nitidiflorus* son polinizadas por abejas del género *Osmia*, también conocidas como “abejas albañiles” por construir sus nidos y celdas con barro.



Imagen 12. Detalle de una abeja albañil posada sobre un piroclasto originado en el afloramiento volcánico de los Pérez Bajos.

1.1.4.4. Dispersión de los frutos

Los frutos, que son indehiscentes, se dispersan por barocoria, es decir, por la acción de la gravedad, quedando por tanto la mayoría de ellos en las proximidades de la planta madre tras la dispersión.



Imagen 13. Los frutos al madurar en verano se desprenden y quedan debajo de los tallos secos de la planta madre. Cuando la planta rebrota los frutos quedan bajo su sombra.

La capacidad de germinación de las semillas no es muy elevada debido a la dureza de sus cubiertas, por lo que gran parte de ellas se mantienen en el suelo, constituyendo lo que se denomina un banco edáfico de semillas. No obstante, los estudios llevados a cabo indican que la longevidad de las semillas del banco edáfico podría no ir más allá de los cinco o seis años. Por tanto, se piensa que *Astragalus nitidiflorus* podría constituir bancos de semillas edáficos persistentes pero a corto plazo (Martínez-Sánchez, 2010). Este almacenamiento en el suelo de semillas con diferente capacidad

germinativa implica que no todas las semillas dispersadas en un año germinan a la vez, lo que supone en realidad una estrategia de germinación escalonada en el tiempo para que no todas las plántulas emerjan a la vez y corran la misma suerte.



Imagen 14. Germinación de semillas de *Astragalus nitidiflorus* sobre papel de filtro en placas de Petri.



Imagen 15. Detalle de la germinación de semillas de *Astragalus nitidiflorus* donde se observa la emergencia de la radícula.

1.1.4.5. Nodulación con *Rhizobium*

Es conocida la capacidad de las leguminosas para utilizar el nitrógeno atmosférico (N_2) a través de la relación simbiótica que se establece entre estas plantas y las bacterias fijadoras de nitrógeno. El grupo de bacterias al que se conoce colectivamente como rizobios inducen en las raíces de las leguminosas la formación de estructuras especializadas, “los nódulos”, dentro de los cuales el nitrógeno gaseoso se transforma en compuestos fácilmente asimilables por las plantas. En el caso de *Astragalus nitidiflorus* también se produce esta nodulación, al menos con los rizobios de la especie *Rhizobium giardinii* (Martínez-Sánchez *et al.*, 2007).



Imagen 16. Nódulos de *Rhizobium giardinii* que se han desarrollado en plantas de *Astragalus nitidiflorus* cultivadas en maceta con mezcla de turba y suelo del hábitat.

1.1.4.6. Diversidad genética

El conocimiento de los niveles de variación genética de las especies amenazadas es esencial para el diseño de estrategias eficaces de gestión y conservación, ya que la supervivencia a largo plazo de estas especies dependerá de la conservación de suficiente variabilidad genética dentro y entre las poblaciones para que puedan responder a las nuevas presiones de selección provocadas por los cambios ambientales.

Los estudios llevados a cabo sobre la estructura genética de *Astragalus nitidiflorus* muestran que, tanto a nivel de especie como a nivel poblacional, la variabilidad genética es baja, si bien estos resultados se sitúan dentro del rango de valores normales obtenidos para otras especies endémicas y de distribución restringida. Estos datos hacen pensar en que posiblemente existía en el pasado una población mucho mayor y numerosa pero que con el paso del tiempo fue sufriendo una drástica reducción en su número de individuos hasta llegar a la situación actual en la que encontramos pequeños grupos de individuos separados geográficamente pero con mínimas diferencias genéticas entre sí (Vicente *et al.*, 2011).

1.1.5. Ecología

Las poblaciones conocidas de *Astragalus nitidiflorus* habitan sobre sustratos de origen volcánico de naturaleza basáltica, en pastizales termófilos y relativamente nitrificados con cierto grado de alteración antrópica: bordes de cultivos y terrenos de labor abandonados recientemente o abandonados desde hace años pero sometidos a otras alteraciones como es el pastoreo de ovejas. Por el contrario, la especie no es capaz de colonizar las tierras de cultivo que son alteradas frecuentemente, ni puede colonizar áreas que han desarrollado una vegetación sucesional tardía con mayor presencia de nanofanerófitos.



Imagen 17. Hábitat natural de *Astragalus nitidiflorus*. Las plantas del Garbancillo se encuentran sobre terrenos volcánicos de naturaleza basáltica, alterados por la actividad humana.



Imagen 18. Ejemplar de *Astragalus nitidiflorus* sobre basaltos alcalinos volcánicos.

Los suelos han sido clasificados como regosoles. Se trata de suelos alcalinos (con valores de pH en torno a 8), libres de sales, con escaso contenido de carbonatos y con textura franco-arenosa. Presentan un alto contenido de materia orgánica y una relación C/N indicativa de procesos de humificación (Martínez –Sánchez *et al.*, 2007).

Las poblaciones del Garbancillo se encuentran en una zona de clima mediterráneo con carácter semiárido, con una precipitación total anual que oscila entre los 250-300 litros por metro cuadrado, habitando pastizales termófilos ricos en gramíneas vivaces y leguminosas, dominados por *Hyparrhenia sinaica* junto a especies como *Lotus edulis*, *Ononis natrix*, y *Bituminaria bituminosa*. Entre los claros de estos herbazales vivaces encontramos comunidades terofíticas arvenses, mesegueras y de malas hierbas de cultivos de óptimo primaveral como *Galium verucosum*, *Sherardia arvensis*, *Geranium molle*, *Vicia sativa*, *Trifolium stellatum*, *Trifolium campestre*, *Bromus rubens*, *Bromus tectorum*, *Nigella damascena*, *Erodium neuradifolium*, *Vulpia ciliata*, *Cerastium glomeratum*, *Leontodon taraxacoides*, *Rostraria cristata* y *Bellardia trixago*, y otras especies, también terófitas, muy efímeras y xerofíticas como *Linum strictum*, *Trifolium scabrum*, *Euphorbia exigua*, *Valantia hispida*, *Asterolinum linum-stellatum*, *Neatostema apulum*, *Helianthemum salicifolium* y *Hedysarum spinosissimum*.

1.1.6. Corología y tamaño poblacional.

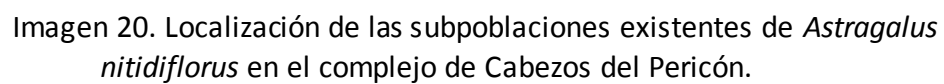
Se trata de un endemismo murciano-almeriense presente únicamente en el término municipal de Cartagena. Actualmente, la planta cuenta con una única población natural situada al oeste de la ciudad, en el complejo de Cabezos del Pericón, fragmentada en cuatro subpoblaciones: Pérez Bajos, Cabezo Negro de Tallante, Cabezo Negro de los Pérez y Cabezo Blanco y Los Lorenzales.



Imagen 19. Cabezo Negro de Tallante, volcán extinguido que constituye el último episodio de vulcanismo del sureste español hace 2,6 millones de años.

Formando un polígono imaginario con todos los puntos en los que se han encontrado individuos de *Astragalus nitidiflorus*, el área de presencia de la especie tendría una superficie aproximada de 2,87 km².

A finales de febrero de 2012, el tamaño de la población se estimó en unos 135 ejemplares reproductores, 17 en la localidad de Pérez Bajos, 18 en el Cabezo Negro y más de 100 en el Cabezo Blanco. La subpoblación del Cabezo Negro de Tallante está desaparecida desde 2010.



1.1.7. Protección

Normativa Legal

Nacional

La especie *Astragalus nitidiflorus* se incluye en el Real Decreto 139/2011 para el desarrollo del Listado de Especies Silvestres en Régimen de Protección Especial y del Catálogo Español de Especies Amenazadas como En Peligro de Extinción.

Autonómica

Fue catalogada "De Interés Especial" en el Catálogo Regional de Flora Silvestre Protegida de la Región de Murcia (*Decreto 50/2003, BORM núm. 131*). Esta categoría está reservada a las especies que sin estar contempladas en las categorías superiores son merecedoras de una atención particular en función de su valor científico o ecológico por su singularidad. En el momento de la redacción del Decreto 50/2003 el taxón no había vuelto a encontrarse tras su descripción en 1910 y excepcionalmente se consideró como "De Interés Especial" para que en el caso de que fuera reencontrado no quedara desprotegido.

Posteriormente ha sido catalogada como "En peligro de extinción" en el Catálogo Español de Especies Amenazadas (*Real Decreto 139/2011, BOE núm. 3582*). Esta categoría hace referencia a la especie, subespecie o población de una especie cuya supervivencia es poco probable si los factores causales de su actual situación siguen actuando. Para el caso de especies incluidas en esta categoría se evaluará los factores de riesgo, como complemento a la conservación in situ, se promoverá la realización de programas de cría en cautividad, de conservación ex situ o de propagación fuera de su hábitat natural, para los programas o estrategias de conservación o recuperación de la especie. Estos programas estarán dirigidos a la constitución de reservas genéticas y/o a la obtención de ejemplares aptos para su reintroducción al medio natural.

1.1.8. Amenazas

En este apartado se analizan los principales factores bióticos y abióticos de amenaza citados, observados o potenciales para la especie:

1.1.8.1. Factores bióticos

Fragmentación y pequeño tamaño poblacional

La escasa población conocida de la especie se reparte en cuatro subpoblaciones entre las que el flujo genético es muy bajo. Estas subpoblaciones están separadas geográficamente, aunque próximas unas a otras, ya que se localizan en un área delimitada por un radio de menos de 1,5 km. La conectividad entre ellas está impedida también por la orografía del terreno, ya que existen microcuencas hidrográficas que las separan.

En general, las poblaciones pequeñas y fragmentadas están sometidas a un mayor riesgo de regresión y extinción como consecuencia de su mayor vulnerabilidad ante problemas genéticos, fluctuaciones demográficas y ambientales. La estocasticidad demográfica, fenómenos catastróficos o cualquiera del resto de factores de amenaza detectados sobre la especie se verán potenciados al distribuirse la población en grupos pequeños y aislados entre sí, lo que supone un riesgo real que puede comprometer el futuro de la especie.

Por otro lado, las importantes fluctuaciones en el número de individuos y en la relación juveniles/adultos podrían comprometer la supervivencia de la especie ya que agravan los problemas propios de la distribución fragmentada y el pequeño tamaño de las subpoblaciones.

Depredación y plagas

Aunque no se han evidenciado daños importantes, un depredador a tener en cuenta podría ser el conejo (*Oryctolagus cuniculus*), ya que en el área de distribución de la especie es muy abundante. La sobrepoblación de conejo podría provocar daños de importancia sobre los individuos. Aunque no la consume, si se han observado daños por corte de tallos e infrutescencias.

En cuanto a las plagas, se han observado perforaciones de semillas provocadas por *Bruchophagus astragali* (Martínez-Sánchez *et al.*, 2007), un himenóptero de la Familia *Eurytomidae*. Las hembras de *Bruchophagus astragali* perforan el fruto y ponen sus huevos dentro de la semilla. Días después nacen las larvas que para desarrollarse se alimentan del contenido de la semilla. El insecto adulto emerge a través de una perforación de la semilla que queda vacía.



Imagen 21. Hembra de *Bruchophagus astragali*.

Competencia con especies invasoras

La invasión de vinagrillo (*Oxalis pes-caprae*) observada en algunos campos abandonados en donde crece la especie podría suponer una verdadera amenaza debido a la competencia con las jóvenes plantas de garbancillo.

1.1.8.2. Factores abióticos

Sequías prolongadas

La mortalidad de plántulas causada por deficiencia hídrica en el periodo estival es muy alta, de modo que entre el 70 y el 100% de las plántulas mueren en su primer verano. La sucesión de años muy secos podría ser fatal para el mantenimiento de las poblaciones, no sólo por la escasa producción anual de semillas sino también por la duración limitada de las semillas en el banco del suelo ya que no se podría regenerar la población a partir de su banco de semillas.

Fenómenos catastróficos

No se conoce la posible incidencia en el pasado reciente de fenómenos catastróficos. Es complejo estimar la magnitud de la amenaza por los fenómenos más probables en el sureste ibérico, como incendios e inundaciones. No obstante, la fragmentación y pequeño tamaño de las poblaciones hacen que la especie sea vulnerable a cualquier suceso extraordinario y grave.

1.1.8.3. Factores antrópicos

Recolección

La recolección incontrolada de plantas o frutos sería extremadamente grave para la especie debido a su bajo éxito reproductor y la limitada duración de las semillas en el banco edáfico del suelo.



Imagen 22. La proporción de flores que se convierten en frutos es muy baja, apenas alcanza el 20%, lo que da lugar a una media de 4-5 frutos por inflorescencia.



Imagen 23. Germinación de semillas del Garbancillo en el interior del fruto.

Modificación de prácticas agrícolas y de uso del suelo

Astragalus nitidiflorus tiene escasa plasticidad ecológica, dependiendo de un hábitat en el que se precisa cierto grado de alteración, generalmente ligado a prácticas agrícolas y ganaderas tradicionales, lo que hace obligatorio el mantenimiento de dichas prácticas.



Imagen 24. Cultivo de almendros, representativos del entorno asociado al Garbancillo de Tallante.

Por el contrario, una alteración excesiva, como el laboreo intenso, podría causar un efecto negativo impidiendo el establecimiento de las plantas. Un pastoreo excesivo también puede ser perjudicial, ya que el ramoneo de las plantas produce la pérdida de vigor y puede dañar los tallos floríferos y, en consecuencia, disminuir la producción de semillas.

Por otro lado, el abandono de la actividad agrícola compatible con la conservación de la especie es una importante amenaza sobre el hábitat de *Astragalus nitidiflorus*, ya que el abandono a medio o largo plazo de las labores parece afectar negativamente a la especie, que no progresa o lo hace con suma dificultad en terrenos en los que se establecen especies propias de etapas de sucesión más avanzada, como matorrales de nanofanerófitos.



Imagen 25. Ladera de un cabezo volcánico colonizada por arbustos de baja talla. Estas plantas son propias de etapas de sucesión ecológica más avanzada.

En general, cualquier cambio de uso que conlleve la eliminación de prácticas que suponen una alteración leve del horizonte superficial afectaría sensiblemente a las poblaciones a medio-largo plazo. También se deben considerar amenazas potenciales la posible urbanización y la construcción de nuevas vías de comunicación (Carrión *et al.*, 2007).

Visto que *Astragalus nitidiflorus* puede considerarse una especie propia de las etapas de sucesión temprana, el mantenimiento de este hábitat y su manejo compatible parece ser el punto crítico para la preservación de la especie.



Imagen 26. Pastor con su rebaño, como muestra de las actividades tradicionales del entorno.

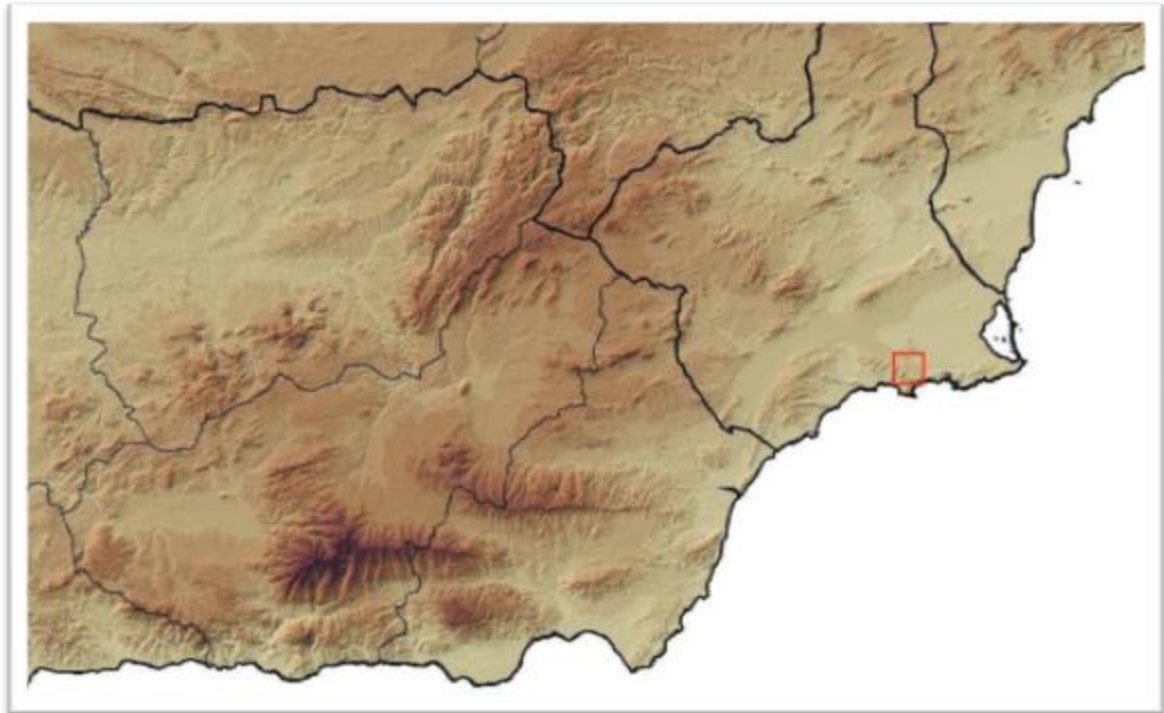


Imagen 27. Localización de la población de *Astragalus nitidiflorus* en la Región de Murcia (Sánchez *et al.*, 2004).

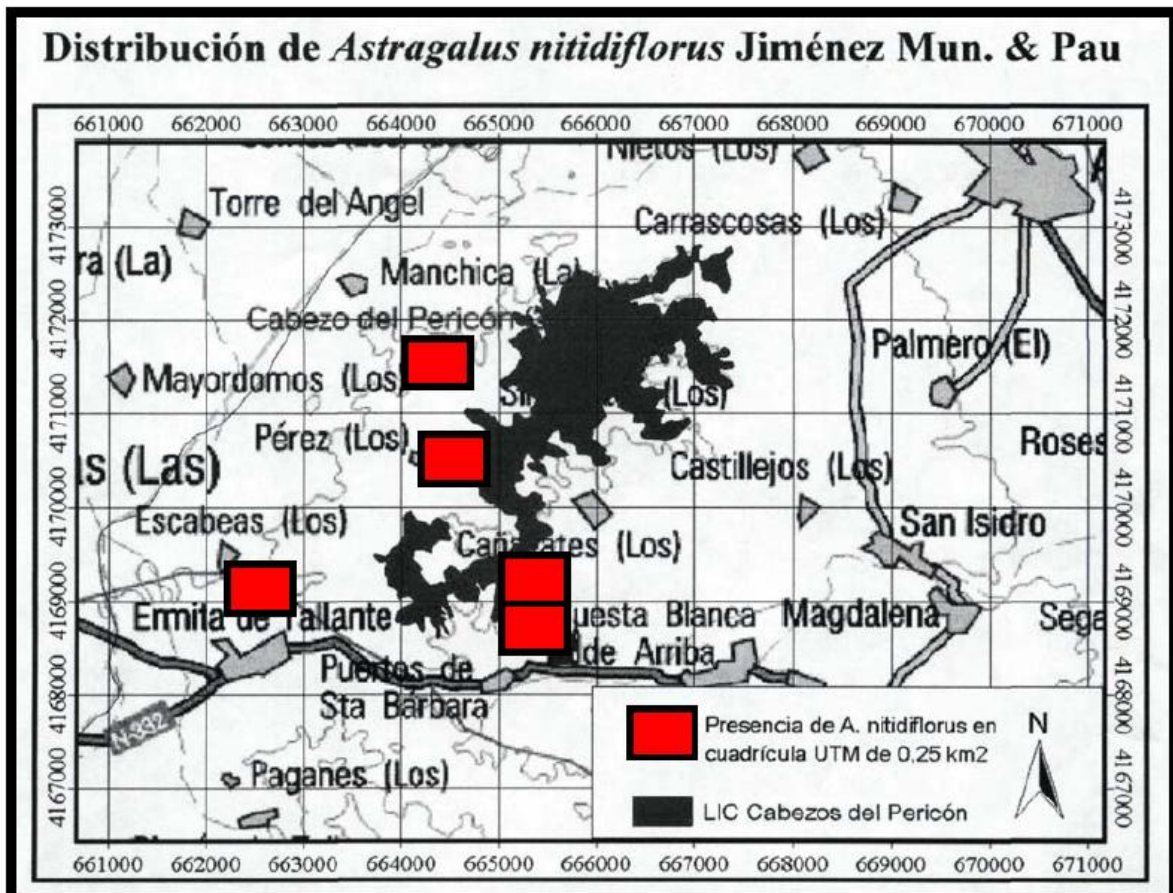


Imagen 28. Distribución de *Astragalus nitidiflorus* en cuadrícula UTM de 0,25 km 2 (Dirección General del Medio Natural, 2004).

1.2. Los rizobios

1.2.1. Origen del estudio y taxonomía

Desde hace más de un siglo se conoce la simbiosis entre unas bacterias del suelo y plantas leguminosas. El término rizobio se emplea para denominar a las bacterias que se encuentran en el suelo y tienen la capacidad de infectar raíces de plantas leguminosas e inducir la formación de nódulos. Este grupo de bacterias Gram-negativas se engloban en diferentes familias dentro de las α -Proteobacteria (phylum *Proteobacteria*, dominio *Bacteria*).

Los nódulos que aparecen en las raíces de las leguminosas en presencia de rizobios son unos órganos especializados de los tejidos radiculares de la planta para albergar a las bacterias fijadoras de N_2 (Taiz & Zeiger, 2006).

Inicialmente, los microorganismos capaces de nodular leguminosas se denominaron *Bacillus radicicola* (Beijerinck, 1888), y más tarde se pasó a hablar de *Rhizobium* con una sola especie *Rhizobium leguminosarum* (Frank, 1889).

Con el paso del tiempo se fueron definiendo nuevas especies de rizobios, al principio basándose en criterios de infectividad y fenotípicos y a partir de la década de los 80, en criterios moleculares, especialmente en la secuenciación de genes, principalmente del gen ribosómico 16S. A partir del 2000 se describieron además nuevos géneros que se distribuyeron en diferentes familias (tabla 3).

Recientemente se ha demostrado que la capacidad para inducir la formación de nódulos va más allá de las bacterias incluidas en el orden *Hyphomicrobiales*, ya que se ha descubierto la nodulación de algunas leguminosas por miembros de las β -Proteobacteria. Igualmente hay algunas especies de plantas no leguminosas con capacidad para establecer simbiosis con bacterias fijadoras de nitrógeno, como ocurre con el género *Parasponia*.

Como se puede observar en la tabla 3, actualmente existen varias especies filogenéticamente relacionadas con los rizobios que no nodulan leguminosas, entre ellas cabe destacar al género *Agrobacterium*, reclasificado en el género *Rhizobium* por Young *et al.* (2001). Pero esta propuesta no ha sido aceptada por todos los investigadores y Farrand *et al.* (2003), con el apoyo de investigadores de distintos países, propusieron mantener el género *Agrobacterium* y rechazaron su inclusión en *Rhizobium*. El argumento para mantener en géneros diferentes las especies de *Agrobacterium* y *Rhizobium* se basó en primer lugar en la naturaleza polifilética de ambos géneros de acuerdo con las evidencias encontradas al analizar las secuencias del gen ribosómico 16S.

Se han estudiado varias especies de Leguminosae (*Lupinus*, *Astragalus*, *Trifolium*) en U.S.A. que presentan micorrizas V/A con hifas aseptadas, o micorrizas formadas por hifas septadas que a menudo forman esclerocios intracelulares (O'Dell & Trappe, 1992).

Tabla 2. Clasificación taxonómica de los rizobios: (#: no rizobios con capacidad de nodular en simbiosis con leguminosas; *: especies sin capacidad de nodulación descrita en los rizobios) (Rivas et al., 2009).

α-Proteobacteria - Orden Hyphomicrobiales			
Familia	Género	Especie	Planta Hospedadora
<i>Rhizobiaceae</i>	<i>Rhizobium</i>	<i>R. alamae</i>	*
		<i>R. alkalisoli</i>	<i>Caragana</i>
		<i>R. cellulolyticum</i>	*
		<i>R. daejeonense</i>	<i>Medicago</i>
		<i>R. etli</i>	<i>Phaseolus</i>
		<i>R. fabae</i>	<i>Vicia</i>
		<i>R. galegae</i>	<i>Galegae</i>
		<i>R. gallicum</i>	<i>Phaseolus</i>
		<i>R. giardinii</i>	<i>Phaseolus</i>
		<i>R. hainanense</i>	<i>Desmodium</i>
		<i>R. huautlense</i>	<i>Sesbania</i>
		<i>R. indigoferae</i>	<i>Indigofera</i>
		<i>R. larrymoorei</i>	*
		<i>R. leguminosarum</i>	<i>Pisum</i>
		<i>R. loessense</i>	<i>Astragalus</i>
		<i>R. lusitanum</i>	<i>Phaseolus</i>
		<i>R. mesosinicum</i>	<i>Leguminosas chinas</i>
		<i>R. miluonense</i>	<i>Lespedeza</i>
		<i>R. mongolense</i>	<i>Medicago</i>
		<i>R. multihospitium</i>	<i>Leguminosas chinas</i>
		<i>R. oryzae</i>	<i>Oryza</i>
		<i>R. phaseoli</i>	<i>Phaseolus</i>
		<i>R. pisi</i>	<i>Pisum</i>
		<i>R. radiobacter</i>	*
		<i>R. rhizogenes</i>	*
		<i>R. rubi</i>	*
		<i>R. selenitireducens</i>	*
		<i>R. sullae</i>	<i>Hedysarum</i>
		<i>R. tibeticum</i>	<i>Medicago</i>
		<i>R. tropici</i>	<i>Phaseolus</i>
		<i>R. undicola</i>	*
		<i>R. vitis</i>	*
		<i>R. yanglingense</i>	<i>Amphicarpaea</i>
	<i>Ensifer (Sinorhizobium)</i>	<i>E. americanus</i>	<i>Acacia</i>
		<i>E. arboris</i>	<i>Acacia</i>
		<i>E. fredii</i>	<i>Glycine</i>
		<i>E. kostiense</i>	<i>Acacia</i>
		<i>E. kummerowiae</i>	<i>Kummerowia</i>
		<i>E. meliloti</i>	<i>Medicago</i>
		<i>E. medicae</i>	<i>Medicago</i>
		<i>E. morelense</i>	*
		<i>E. saheli</i>	<i>Acacia</i>
		<i>E. terangae</i>	<i>Acacia</i>
		<i>E. xinjiangense</i>	<i>Glycine</i>
		<i>E. adhaerens</i>	*

Tabla 2. Continuación - Clasificación taxonómica de los rizobios: (#: no rizobios con capacidad de nodular en simbiosis con leguminosas; *: especies sin capacidad de nodulación descrita en los rizobios) (Rivas et al., 2009).

α-Proteobacteria - Orden Hyphomicrobiales			
Familia	Género	Especie	Planta Hospedadora
<i>Phyllobacteriaceae</i>	<i>Mesorhizobium</i>	<i>M. albiziae</i>	<i>Albizia</i>
		<i>M. amorphae</i>	<i>Amorpha</i>
		<i>M. australianum</i>	<i>Biserrula</i>
		<i>M. caraganae</i>	<i>Caragana</i>
		<i>M. chacoense</i>	<i>Prosopis</i>
		<i>M. ciceri</i>	<i>Cicer</i>
		<i>M. gobiense</i>	<i>Leguminosas chinas</i>
		<i>M. huakuui</i>	<i>Astragalus</i>
		<i>M. loti</i>	<i>Lotus</i>
		<i>M. mediterraneum</i>	<i>Cicer</i>
		<i>M. metallidurans</i>	<i>Anthyllis</i>
		<i>M. opportunistum</i>	<i>Biserrula</i>
		<i>M. plurifarum</i>	<i>Acacia</i>
		<i>M. septentrionale</i>	<i>Astragalus</i>
		<i>M. shangrilense</i>	<i>Caragana</i>
		<i>M. tarimense</i>	<i>Leguminosas chinas</i>
		<i>M. temperatum</i>	<i>Astragalus</i>
		<i>M. thiogangeticum</i>	*
		<i>M. tianshanense</i>	<i>Sophora</i>
	<i>Phyllobacterium</i>	<i>P. trifolii</i> #	<i>Trifolium</i>
<i>Nitrobacteriaceae</i>	<i>Bradyrhizobium</i>	<i>B. betae</i>	*
		<i>B. canariense</i>	<i>Genisteae</i>
		<i>B. elkanii</i>	<i>Glycine</i>
		<i>B. japonicum</i>	<i>Glycine</i>
		<i>B. jicamae</i>	<i>Pachyrhizus</i>
		<i>B. liaoningense</i>	<i>Glycine</i>
		<i>B. pachyrhizi</i>	<i>Pachyrhizus</i>
		<i>B. yuanmingense</i>	<i>Lespedeza</i>
	<i>Blastobacter</i>	<i>B. denitrificans</i> #	<i>Aeschynomene</i>
<i>Hyphomicrobiaceae</i>	<i>Azorhizobium</i>	<i>A. caulinodans</i>	<i>Sesbania</i>
		<i>A. doebereineriae</i>	<i>Sesbania</i>
	<i>Devosia</i>	<i>D. neptuniae</i> #	<i>Neptunia</i>
<i>Brucellaceae</i>	<i>Ochrobactrum</i>	<i>O. lupini</i> #	<i>Lupinus</i>
		<i>O. cytisi</i> #	<i>Cytisus</i>
<i>Methylobacteriaceae</i>	<i>Methylobacterium</i>	<i>M. nodulans</i> #	<i>Crotalaria</i>

β-Proteobacteria - Orden Burkholderiales			
	<i>Burkholderia</i>	<i>B. cepacia</i>	<i>Dalbergia</i>
		<i>B. mimosarum</i>	<i>Mimosa</i>
		<i>B. nodosa</i>	<i>Mimosa</i>
		<i>B. phymatum</i>	<i>Machaerium</i>
		<i>B. sabiae</i>	<i>Mimosa</i>
		<i>B. tuberum</i>	<i>Aspalathus</i>
	<i>Cupriavidus</i>	<i>C. taiwanensis</i>	<i>Mimosa</i>

1.2.2. Establecimiento de la relación simbiótica entre la leguminosa y el rizobio

1.2.2.1. Iniciación del nódulo

1.2.2.1.1. Señalización entre la planta y *Rhizobium*

La simbiosis entre plantas y bacterias con capacidad de fijación de nitrógeno comienza con la percepción de la presencia entre ellas en la rizosfera. El establecimiento de la simbiosis es un proceso específico, lo que implica que no todas las bacterias capaces de inducir nodulación de plantas lo hará con todas las plantas con capacidad de nodulación, sino que se han desarrollado especificidades en la interacción, de modo que cada especie vegetal sólo nodula con unas determinadas especies bacterianas. Además, la base genética del establecimiento de la simbiosis en la bacteria se encuentra en el plásmido *pSym*, lo que implica que su pérdida supone la inoperancia del rizobio como nodulador y fijador de nitrógeno (Madigan *et al.*, 2003).

Sustancias de naturaleza flavonoide exudadas por la raíz vegetal como metabolitos secundarios son las responsables de la iniciación del proceso, al ser reconocidas por las bacterias de la rizosfera, entre las que se encuentran en forma saprofítica los rizobios (Stacey, 2007). Estas sustancias activan la transcripción de los genes *nod* del rizobio, que codifica para una proteína (lipo-quitina modificada) llamada señal Nod. Ésta es reconocida por la planta y sirve como señal activadora del proceso de transcripción de genes responsables de la formación del primordio nodular en los pelos radiculares. La capacidad para inducir nodulación en la raíz de la planta viene determinada por la presencia de genes *nod* en la bacteria, y parece ser que sólo en los rizobios existe esta capacidad entre todos los procariotas.

Se puede definir como rizosfera a la porción de suelo íntimamente asociada a las raíces de plantas en crecimiento con propiedades físicas, químicas y biológicas diferentes a las del resto del suelo y con una estructura extraordinariamente compleja en la que inciden gran número de variables y en la que se establecen multitud de relaciones biológicas. De hecho, las características físico-químicas de dicha región hacen de ella un lugar muy adecuado para el crecimiento de microorganismos (Bazin M.J. y col., 1990), de los cuales los más abundantes son las bacterias, en gran parte propiciado por la presencia de los exudados de la planta ricos, entre otros, en compuestos carbonados.

Los factores *Nod* están compuestos por un esqueleto de N-acetil-D-glucosamina unidos por enlaces β -1,4 sintetizado por NodA, NodB y NodC, que presenta una serie de modificaciones dependiendo de la estirpe de *Rhizobium*.

Señalización entre *Rhizobium* y la planta:

La mera presencia de los factores *Nod* en concentraciones del orden 10^{-12} M es suficiente para que en la planta se produzca la deformación de los pelos radicales (Lerouge P. y col., 1990; Heidstra R. y col., 1994) pero se necesitan niveles mayores, del orden de 10^{-7} a 10^{-9} M para provocar la formación de los pre-canales de infección, la división de las células corticales y la inducción de genes implicados en las fases previas a la nodulación, las nodulinas tempranas (Truchet G. y col., 1991).

1.2.2.1.2. Invasión y formación del canal de infección

La unión de las bacterias a la superficie de la raíz es un paso preliminar muy importante que precede a la invasión. Fibrillas de celulosa producidas por la bacteria pueden ayudar a enredar al rizobio en la superficie mucilaginosa de la raíz, proceso reforzado por la presencia de proteínas dependientes de Ca^{2+} , ricadhesinas, producidas por la bacteria (Smith G. y col., 1989). Es por ello que los polisacáridos y proteínas producidos por *Rhizobium* pueden jugar un papel importante en la interacción física entre la planta y la bacteria.

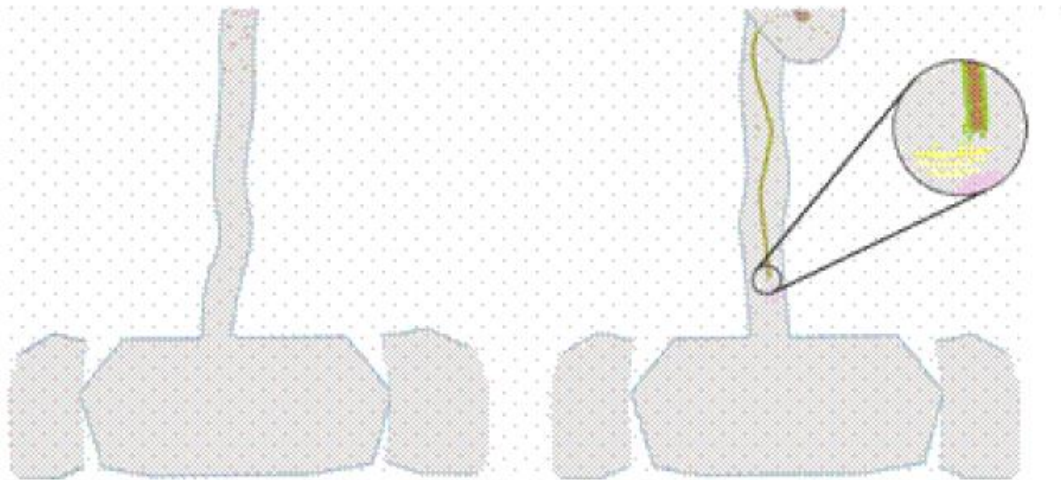


Imagen 29. Modelo esquemático, mostrando la colonización (A) y la deformación del pelo radicular y formación del canal de infección (B) por *Rhizobium*.

Paralelamente y coincidiendo con la entrada de la bacteria en el pelo radicular, en el interior del mismo se produce un trasiego de vesículas que volcarán su contenido en el entorno de la bacteria (Brewin N.J., 1991) formando así los primordios del canal de infección, estructura a través de la cual las bacterias van a discurrir por la planta hasta llegar al nódulo. Las estructuras preinfectivas se inducen por acción de LCOs en leguminosas con nódulos indeterminados (van Brussel A.A.N. y col., 1992). La formación del dicho "camino" de infección está dirigida por la planta merced a la deformación del citoesqueleto que induce una invaginación en la vacuola generando los llamados puentes citoplasmáticos (van Brussel A.A.N. y col., 1992) cuya orientación comunica unas células con otras y por los cuales irá creciendo la bacteria. A lo largo de toda la luz del canal existe una matriz glucoproteica cuyos componentes proceden tanto de la planta como de la bacteria (Broughton W.J. y col., 2000). Así, por parte de *Rhizobium* nos encontramos, entre otros, glúcidos cíclicos, lipopolisacárido (LPS), fundamental para una correcta infección, succinoglucano y EPS, siendo éste último crucial para la iniciación y posterior elongación del canal de infección (Cheng H.P. y Walker G.C., 1998).

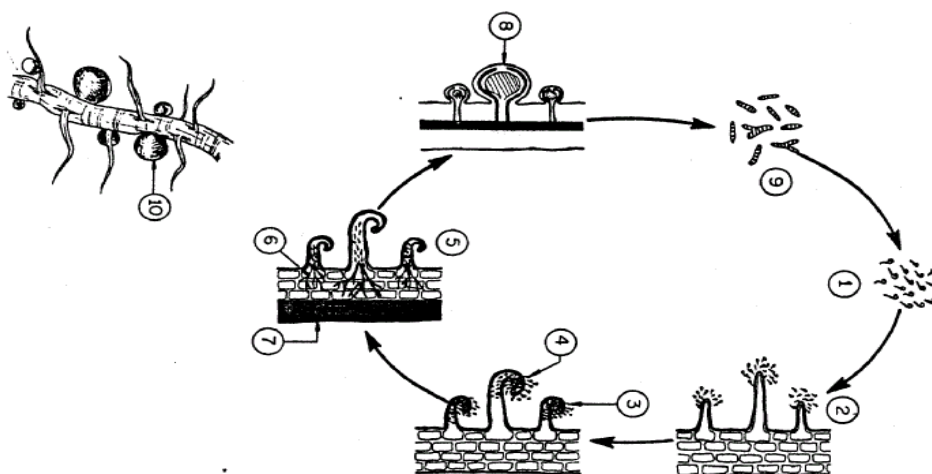


Imagen 30. Dinámica de formación de un nódulo en la raíz en una leguminosa causado por *Rhizobium*.

1. *Rhizobium* libre.
2. *Rhizobium* atraído por el pelo radical.
3. Inicio de la infección por *Rhizobium* en el pelo radical.
4. Cayado del pastor (pelos radicales, infectados por *Rhizobium*).
- 5 Y 6. El cordón de infección de *Rhizobium* invade la matriz de células corticales de la leguminosa en la raíz.
7. *Rhizobium* se reproduce en células haploides de la raíz y pierde su pared celular se sobreproduce auxina.
8. Resultado se da la hipertrofia radical y aparece el nódulo.
9. *Rhizobium* sin pared (Bacterioide) en las células corticales fija nitrógeno.
10. El nódulo con leghemoglobina fija N_2 .

1.2.2.1.3. Estructura y desarrollo de los nódulos

El desarrollo de un nódulo requiere que las células corticales se desdiferencien para formar un primordio nodular y que las bacterias entren en la planta de forma controlada. Los rizobios establecen microcolonias o biopelículas en la superficie de las raíces, interviniendo en este proceso moléculas como las adhesinas y lectinas. Después las bacterias invaden los pelos radicales emergentes provocando su curvatura y dando lugar a una típica morfología denominada "cayado de pastor". Las bacterias quedan atrapadas en el hueco de dicha curvatura y provocan la hidrólisis local de las células de la pared vegetal y la invaginación de la membrana plasmática. Se forma el llamado canal de infección, una estructura tubular por la que penetran, y en la que proliferan, los rizobios. El canal de infección avanza hasta alcanzar la base del pelo radical y las bacterias son liberadas al espacio intercelular, estableciéndose un nuevo canal de infección en las células corticales.

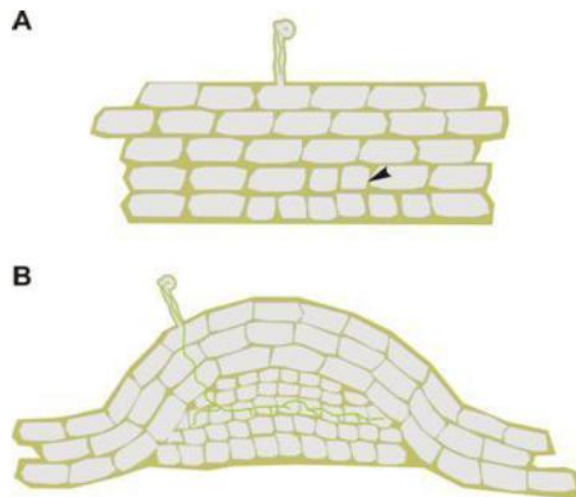


Imagen 31. Esquema de las fases iniciales de la formación del nódulo (A): inducción del ciclo celular en células del córtex (flecha); (B): progresión y ramificación del canal de infección en las células recién formadas

Se han descrito dos tipos morfológicos de nódulo, el tipo determinado y el indeterminado (Stacey, 2007; Sprent, 2005). El primero, que se forma en plantas como soja o alubia, se inicia con sucesivas divisiones de las células del córtex radicular formando una estructura de nódulo globular con tejido periférico vascular. Los nódulos indeterminados son más alargados, debido a que crecen en longitud desde un meristemo apical (Imagen 34 y 35).

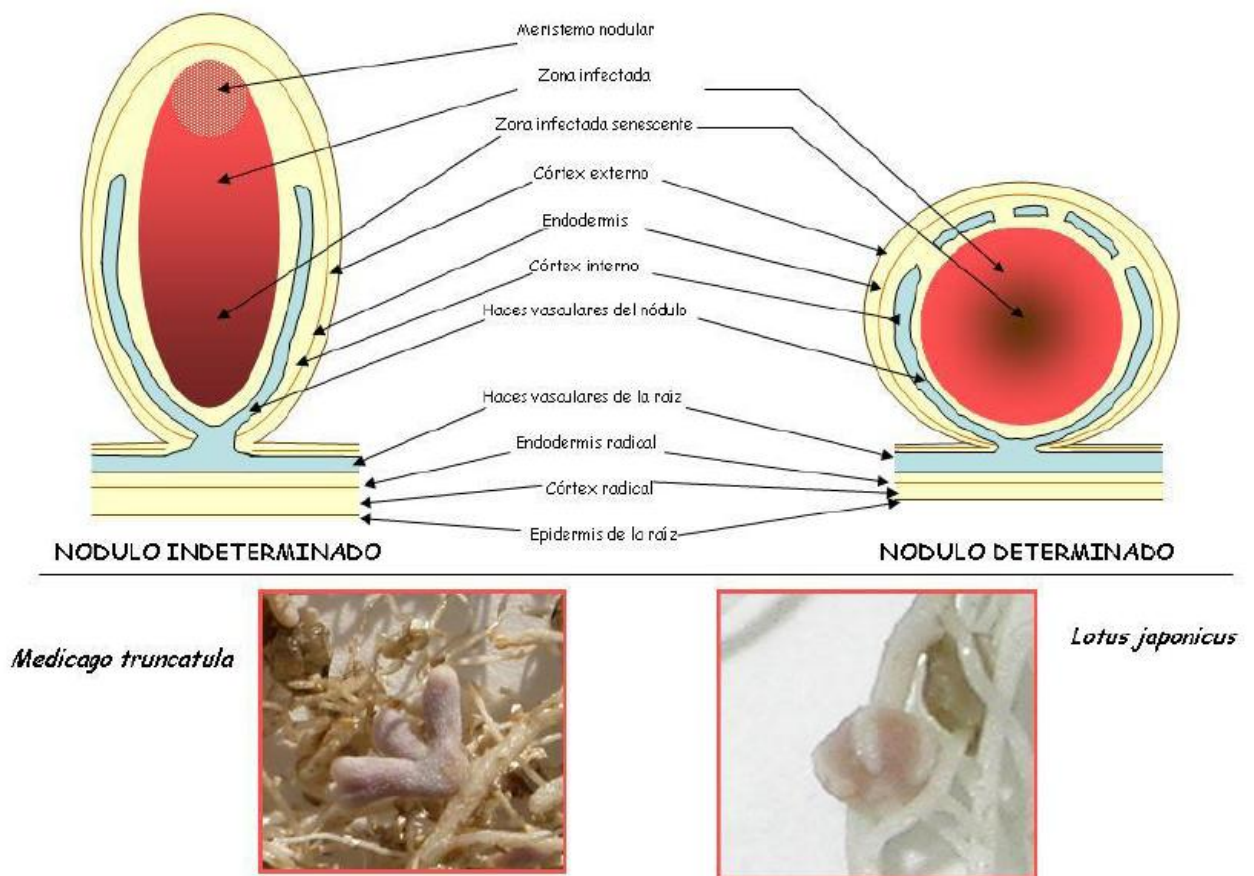


Imagen 32. Morfología de un nódulo indeterminado de *Medicago truncatula* y de un nódulo determinado de *Lotus japonicus* (Buchanan et al. 2000)

Los simbiosomas de los nódulos indeterminados están ocupados por un único bacterioide mientras que los de nódulos determinados pueden contener un número variable. Las leguminosas de climatemplado (alfalfa, guisante, haba) desarrollan nódulos indeterminados y transportan el N fijado a la parte aérea en forma de amidas, mientras que las de clima tropical o subtropical (Lotus, soja, judía) desarrollan nódulos determinados y exportan ureidos.

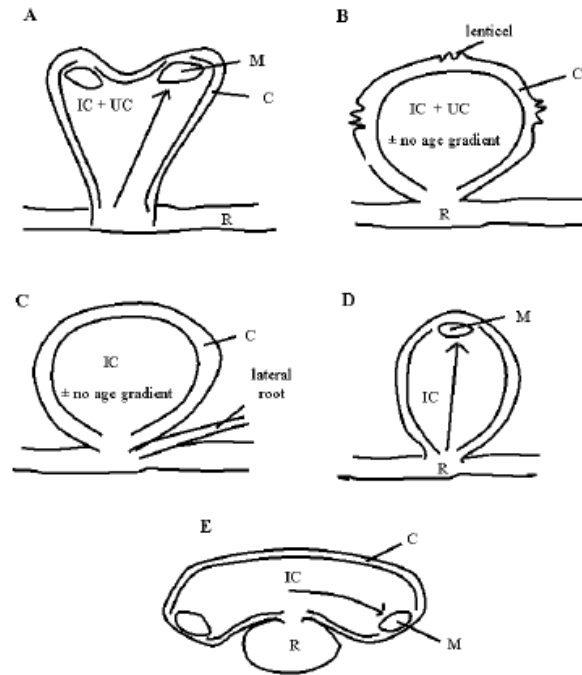


Imagen 33. Tipos de Nódulos: (A) nódulo indeterminado, presente en las tres subfamilias, con uno o varios meristemas apicales (M: meristemo, C: córtex, IC: tejido infectado, UC: tejido no infectado, la flecha indica el gradiente decreciente de edad dentro del nódulo); (B) nódulo desmodioide (determinado); (C) nódulo aeschynomenoide (determinado); (D) nódulo indeterminado (Genisteae); (E) nódulo lupinoide (Sprent, 2005).

Los nódulos indeterminados se caracterizan por tener un meristemo persistente, se originan a partir de primordios establecidos en el córtex interno y son alargados, mientras que los determinados se inician en el córtex externo y son esféricos. Existen cuatro zonas diferenciadas, zona I (meristemo), zona II (zona de invasión), zona III (fijadora de N_2) y zona IV (zona senescente). En la zona III, presente en los dos tipos de nódulos, es donde se encuentran las células infectadas y también células no infectadas (células intersticiales) que tienen una función especial en la asimilación del N. Esta zona central está rodeada por un córtex, endodermis y parénquima nodulares. El tejido más externo contiene el haz vascular. Los rizobios que logran infectar las células de las raíces se diferencian en bacteroides, en cuyo interior se produce la fijación de N_2 . Los bacteroides se encuentran rodeados de una membrana de origen vegetal constituyendo un nuevo compartimento denominado simbiosoma.

El equilibrio en el intercambio de metabolitos entre la planta y el microorganismo resulta vital para la simbiosis, de tal forma que, una alteración del mismo producida por alguno de los dos miembros de la asociación, llevaría a una acidificación en el interior del simbiosoma que conduciría a la activación de las hidrolasas y por lo tanto a la muerte del simbiosoma y a la senescencia del nódulo.

1.2.3. La fijación biológica de nitrógeno al desarrollo de inoculantes microbianos.

1.2.3.1. Información general sobre la fijación del nitrógeno

Los seres vivos pueden sintetizar moléculas nitrogenadas a partir de componentes nitrogenados como aminoácidos, bases púricas o pirimídicas, del amonio o nitratos, o utilizar el nitrógeno elemental (N_2), forma abundante en la atmósfera y en el agua (Fuentes et al., 2003).

La fijación del nitrógeno atmosférico es el proceso por el cual el nitrógeno contenido en el aire se reduce a amoníaco gracias a factores abióticos (como consecuencia de la combustión de compuestos orgánicos, descargas eléctricas...) o biológicos, debida a la actuación de distintos microorganismos que lo reducen a través de una enzima llamada nitrogenasa para la producción de proteínas. Los microorganismos responsables son bacterias y cianobacterias de vida libre en el suelo, eventualmente asociados a una planta, o viviendo en simbiosis con la misma.

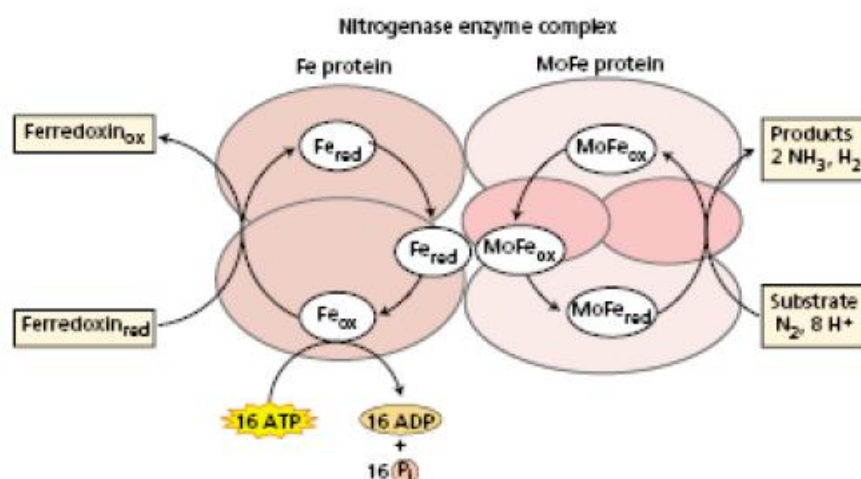
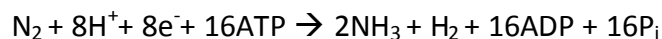


Imagen 34 .Funcionamiento del complejo de la nitrogenasa (Taiz & Zeiger, 2006).

El nitrógeno, junto con el agua, es uno de los principales factores limitantes de la producción vegetal. Aunque la reserva de nitrógeno molecular (N_2) es enorme (atmósfera, rocas sedimentarias y primarias, etc.), las únicas formas asimilables por la planta son las minerales, NH_4^+ y principalmente NO_3^- .

En la naturaleza, sólo un grupo minoritario de procariotas, denominados genéricamente diazótrofos, son capaces de reducirlo a NH_4^+ a través de un proceso conocido como fijación biológica de nitrógeno (FBN), que consiste en romper la unión triple de N_2 . En la FBN es clave la enzima nitrogenasa, responsable de la reducción de N_2 a NH_3 , que requiere energía en forma de ATP y poder reductor (Monza y Palacios, 2204).

La reducción de nitrógeno es un proceso que necesita de una gran cantidad de energía, debido principalmente a la dureza del triple enlace que une los 2 átomos de nitrógeno, necesitando consigo de un consumo de 16 moléculas de ATP por cada mol de nitrógeno reducido, atendiendo a la siguiente fórmula:



La fijación biológica del nitrógeno es una ventaja para las plantas, que pueden hacer uso de ella y permite ganancias muy importantes de nitrógeno en los ecosistemas. Existen otras posibilidades de suministro de nitrógeno, pero ésta realiza la contribución más importante, particularmente a través de la simbiosis Rhizobium-leguminosa.

1.2.3.2. El ciclo del nitrógeno y la fijación de N₂ atmosférico

Los seres vivos cuentan con una gran proporción de nitrógeno en su composición química, el cual es asimilado por los mismos, y utilizado para formar parte de sus estructuras internas. Una vez utilizado por los primeros niveles de las cadenas tróficas, son devueltos al suelo, donde los descomponedores lo extraen de la biomasa dejándolo en la forma reducida de ión amonio (NH₄⁺), proceso llamado amonificación; que puede ser oxidado a nitrato (nitrificación).

Así parece que se cierra el ciclo biológico esencial, sin embargo el amonio y el nitrato son sustancias extremadamente solubles, que son arrastradas fácilmente por la escorrentía y la infiltración. Al final todo el nitrógeno atmosférico habría terminado, tras su conversión, disuelto en el mar. Los océanos serían ricos en nitrógeno, pero los continentes estarían prácticamente desprovistos de él, convertidos en desiertos biológicos, si no existieran otros dos procesos, mutuamente simétricos, en los que está implicado el nitrógeno atmosférico (N₂). Se trata de la fijación de nitrógeno, que origina compuestos solubles a partir del N₂, y la desnitrificación, una forma de respiración anaerobia que devuelve N₂ a la atmósfera. De esta manera se mantiene un importante depósito de nitrógeno en el aire (donde representa un 78% en volumen).

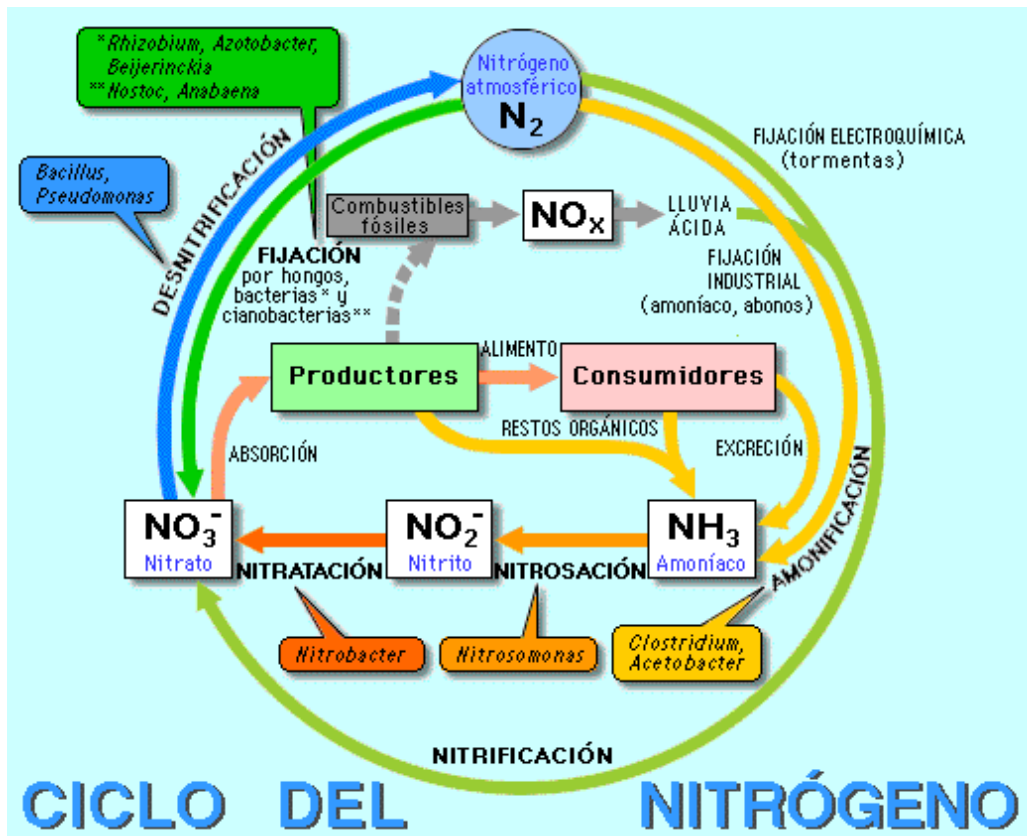


Imagen 35. Ciclo del nitrógeno (MEC, 2008).

Aunque el término fijación normalmente se usa para definir la fijación de N por bacterias (fijación biológica), también incluye la fijación por transformaciones no biológicas (fijación físico-química) las cuales incluyen las reacciones de tipo electroquímico (tormentas eléctricas) y fotoquímico (reacciones entre el ozono y el N_2 atmosférico para la fabricación de amoníaco y ácido nítrico). Pero lo que es más importante aún, el término fijación también incluye una fijación antropogénica, es decir, la realizada por actividades humanas (producción de energía, producción de fertilizantes y cultivos) que produce N “reactivo” (NO_x , NH_3 y $N_{orgánico}$).

La fijación del N desde el estado gaseoso a la forma orgánica se lleva a cabo biológicamente por microorganismos especializados: bacterias (por ejemplo, *Rhizobium* y *Frankia*) y cianobacterias (algas verdes-azules), que convierten el N_2 en otras formas químicas (amonio y nitratos) asimilables por las plantas. La fijación la realizan por medio de un complejo enzimático conocido bajo el nombre de nitrogenasa y es, después de la fotosíntesis, la ruta metabólica más importante para el mantenimiento de la vida en la Biosfera. Curiosamente, este proceso crucial sólo puede ser llevado a cabo por unos pocos grupos de seres vivos, todos ellos procariotas (Sprent J. y Sprent P., 1990).

1.2.4. Los rizobios que nodulan con "*Astragalus*"

Astragalus es capaz de establecer relaciones simbióticas efectivas con varios géneros y especies de rizobios. Se ha observado nodulación en el 5% de las especies (2300) de este género. Entre las bacterias que forman nódulos con las especies de este género encontramos rizobios de crecimiento rápido y con una variada especificidad, como *Sinorhizobium huakuii*, *Rhizobium loessense*, *Mesorhizobium huakuii*, *M. australicum*, *M. caraganae*, *M. opportunistum*, *M. septentrionale* y *M. temperatum*.

1.2.4.1. Características del género *Rhizobium*

Las bacterias en este género son bacilos que miden 0.5-1 x 1.3-3.0 μm se mueven por medio de 1 a 6 flagelos, que pueden ser peritricos o subpolares. Las colonias generalmente son blancas o color beige, circulares, cóncavas, semitranslúcidas u opacas y mucilaginosas; las colonias miden de 2 a 4 mm de diámetro a los 3 o 5 días de incubación en YMA (Levadura Manitol Agar). El crecimiento en medio de carbohidratos generalmente está acompañado de reacción ácida y abundante cantidad de polisacárido extracelular.

Son químic-organotróficas, utilizando una gran variedad de carbohidratos y ácidos orgánicos como fuente de carbono y energía. Algunas cepas requieren biotina, ácido nicotínico, pantotenato o tiamina como factores de crecimiento. Hay 13 especies definidas: *R. leguminosarum*, *R. etil*, *R. galagae*, *R. gallicum*, *R. giardinii*, *R. hhainanense*, *R. huautlense*, *R. indigoferae*, *R. loessense*, *R. mongoliense*, *R. sullae*, *R. tropici*, *R. yanglingense*.

Estas especies nodulan diferentes especies de leguminosas en zonas templadas o tropicales. *R. giardinii* es una rama distantemente relacionada con las otras especies. *R. galegae* y *R. huautlense* tienen una relación más cercana con las especies de *Agrobacterium* que con las otras especies de *Rhizobium*. El resto de las especies y *Agrobacterium rhizogenes* forman un grupo.

Estas especies tienen tres copias de los genes ribosomales y los plásmidos simbióticos son comunes en ellas. Sin embargo, el plásmido puede integrarse en el cromosoma.

Las especies de *Agrobacterium*, *Rhizobium*, y *Allorhizobium* se entremezclan, además de que no se distinguen por características fenotípicas, se ha propuesto combinar los tres géneros en uno solo, lo cual ha sido causa de controversia.

1.2.4.1.2. *Rhizobium giardinii*

Tabla 3. Clasificación científica de la especie *Rhizobium giardinii*

CLASIFICACIÓN CIENTÍFICA	
Reino	<i>Bacteria</i>
Phylum	<i>Proteobacteria</i>
Clase	<i>Proteobacteria alfa</i>
Orden	<i>Rhizobiales</i>
Familia	<i>Rhizobiaceae</i>
Género	<i>Rhizobium</i>
Especie	<i>Rhizobium giardinii</i>

Es una especie que tiene un rápido crecimiento. Las colonias presentan un tamaño de 2 a 4 mm de diámetro después de 2 a 3 días a 28°C. Sin embargo, este crecimiento no se da en YMA que contenga 2% NaCl. Es resistente al ácido nalidixico y tolera un pH en el rango de 4 a 8,5.

Existen dos biovars, *R. giardinii biovar giardinii* y *R. giardinii biovar phaseoli*, cada una de las cuales tienen una nodulación específica. *R. giardinii biovar giardinii* nodula *Phaseolus spp.*, *Leucaena leucocephala*, y *Macroptilium atropurpureum*, pero no fija nitrógeno con *Phaseolus vulgaris*.

1.2.5. Importancia de la biodiversidad y estudio de los rizobios

La agronomía está tomando conciencia de los posibles perjuicios de la pérdida de biodiversidad y la concentración de especies cultivadas a corto plazo. Se han perdido variedades locales adaptadas a un determinado ambiente por la reducción de la superficie dedicada a su cultivo hasta su desaparición, en favor de variedades exóticas más productivas, que pueden poseer mecanismos de defensa vulnerables fuera de su ambiente.

Lo mismo puede ocurrir en las poblaciones microbianas del suelo, condicionadas por el conjunto de factores bióticos y abióticos.

Las bacterias formadoras de nódulos en leguminosas forman parte de la comunidad microbiana del suelo. No obstante, su presencia en el suelo, su cantidad y su diversidad genética son muy variables, sin ser una garantía de una nodulación efectiva ni una eficiencia en la fijación de nitrógeno que mejore el estado nutricional de la planta (Grange *et al.*, 2007; Alberton *et al.*, 2006).

La incorporación de rizobios en lugares donde antes no existían ha mostrado resultados generalmente positivos (Thies *et al.*, 1991). Un ejemplo es el aumento notable del rendimiento del cultivo por la inoculación exitosa de la soja en América (Hungria & Vargas, 2000; Campo *et al.*, 2009), Australia (Fettell *et al.*, 1997; Howieson & Ballard, 2004) o Europa (Albareda *et al.*, 2008), todos ellos lugares lejanos al origen de la soja y carentes de rizobios nativos.

Sin embargo otros estudios han observado una nodulación baja y errática que hace que no sea interesante la práctica de la inoculación del cultivo. No obstante, también hay estudios que han demostrado la viabilidad del empleo de microorganismos como inoculantes cuando presentan capacidad de adaptación a las condiciones ambientales de la zona donde se va a cultivar, en especial si el suelo carece de una población nativa de rizobios (Rodríguez Navarro *et al.*, 2000).

En menor medida se ha prestado atención a los estudios de nodulación y de eficiencia en los que se incluyen diferentes variedades de una misma leguminosa con el mismo rizobio.

1.3. Inoculación para plantas en viveros

1.3.1. Introducción

La inoculación es un proceso de diseminar microorganismos adecuados proporcionando al suelo, semillas o cultivo una elevada población, que sea capaz de multiplicarse en la rizósfera de la plántula. El éxito de la inoculación depende de la calidad de inoculante, así, las bacterias introducidas deben tener los requisitos de eficiencia, competencia, sobrevivencia y agresividad (Zvietcovich).

La inoculación de plantas se inició utilizando microorganismos fijadores de nitrógeno y la industria de producción de inoculantes ha estado siempre estrechamente ligada con la investigación en este campo.

Los agricultores conocían desde hace mucho tiempo que mezclar un suelo donde se había cultivado una leguminosa, transportando de modo inconsciente al microsimbionte, con otro en donde se pretendía cultivar la misma leguminosa mejoraba el rendimiento y esta práctica llegó a ser recomendada a los agricultores en los EE.UU. en el siglo XIX (Smith, 1992).

La inoculación producen unas ventajas entre ellas se destaca, asegurar la provisión de bacterias benéficas para nutrir tempranamente al cultivo y maximizan su producción; permiten la sobrevivencia de la bacteria en condiciones reales de campo; la elección a tiempo de un método de inoculación permite un uso más eficiente del inoculante, debido a que tiene una duración limitada y la posibilidad de sufrir contaminantes (Zvietcovich, 2004).

La dosis más favorable de los inoculantes, depende del tipo de aplicación, así pequeñas unidades de la bacteria aplicadas de forma adecuada pueden mejorar cultivos de gran extensión (Martínez, et al., 2008). Según la FAO, 2001 las poblaciones de 1×10^2 no permiten lograr la debida efectividad de las cepas de *Azotobacter* y *Azospirillum*, por esta razón estas deben ser extraídas de la fase exponencial de crecimiento en cultivos puros y las poblaciones no deben ser menores de 1×10^8 a 1×10^9 UFC/g de suelo.

Se conocen varios métodos de inoculación, estos son al suelo y a la semilla. La inoculación al suelo se emplea para cualquier tipo de cultivo, aunque preferiblemente para semillas que no se pueden impregnar, como es el caso de la caña de azúcar y plantas de semillas muy pequeñas, que tienden a aglomerarse. Esta tiene la ventaja de introducir una población mayor de bacterias que la inoculación a la semilla, existiendo la posibilidad de que la mayoría de ellas sean efectivas. Puede ser líquida o sólida, sin embargo, la inoculación líquida al suelo es la más importante, porque al estar la bacteria en condiciones húmedas del suelo, aumenta su sobrevivencia siempre que sea a temperaturas bajas (Zvietcovich, 2004).

Para la inoculación líquida al suelo, se usa generalmente agua, que varía en función al tamaño de la semilla. Para la inoculación sólida al suelo se puede utilizar materiales como compost, vermiculita, humus; no obstante estos presentan costos más altos para el agricultor, por esta razón, se puede utilizar suelo nativo para distribuir el inoculante sólido (Nitragin, 2002).

El inoculante para el suelo debe ser aplicado antes que la semilla. Si el inoculante es colocado en el fondo del surco la cantidad de bacterias disponibles para infectar las raicillas se encontrarán en un número mayor, teniendo de esta manera mayor posibilidad de cumplir con su cometido (Ventimiglia y Carta, 2005).

Inoculación a la semilla se emplea para semillas de arroz, maíz, sorgo, etc. Este método aporta entre 10^3 y 10^7 UFC/semilla en dependencia del tamaño de la semilla (Saura, et al., 2003).

La importancia de las metodologías de inoculación a la semilla radica, en el contacto de la bacteria con la zona de germinación de la semilla, donde se produce el efecto rizósfera, en el cual la semilla con la humedad del suelo, se hidrata, la planta activa su metabolismo se inicia los cambios bioquímicos (Martínez, et al., 2008).

La inoculación líquida a la semilla, es la metodología más utilizada, por los agricultores. Ha sido conocida por su fácil manejo y en muchos casos se ha comprobado que su eficacia es equivalente a la turba (Nitragin, 2002).

Para la inoculación líquida, se colocan las semillas durante 10 minutos en el inoculantes, para permitir que la semilla se embeba del inoculante (Canto, et al., 2004).

La inoculación de semillas de leguminosas con cepas seleccionadas de *Rhizobium* o constituye una práctica agronómica con más de 30 años de aplicación. El objetivo de la inoculación es lograr una inoculación temprana y una efectiva fijación de N_2 . Las cepas a introducir deben cumplir con dos características: capacidad competitiva frente a los rizobios nativos presentes en el suelo y la persistencia en su nuevo ambiente. Este último aspecto es importante cuando las cepas son inoculadas a especies de leguminosas bianuales o perennes que deben satisfacer las necesidades de nitrógenos del cultivo durante un ciclo de vida más prolongado (Rice, Olsen 1992).

1.3.2. Estudios de biodiversidad y caracterización de rizobios

Los estudios que analizan la biodiversidad o la caracterización de microorganismos beneficiosos para las plantas están generalmente basados en la electroforesis de ácidos nucleicos, principalmente del ADN (Peix *et al.*, 2007).

También existen algunos estudios de biodiversidad y caracterización bacteriana basados en el ARN, de hecho el ARN de bajo peso molecular (LMW-RNA) es una herramienta para la agrupación de aislados (Velázquez *et al.*, 2001a).

El empleo de técnicas basadas en la amplificación del ADN mediante la PCR (*polymerase chain reaction*) se ha generalizado, en gran parte por la facilidad de las técnicas y su economía. Entre las técnicas basadas en la PCR, la secuenciación de fragmentos de ADN de los microorganismos es apropiada para la identificación taxonómica, pero no tanto para los estudios de biodiversidad, ya que la secuenciación aún es una técnica compleja para un número elevado de aislados (Peix *et al.*, 2007).

Sin embargo, para ello se han desarrollado técnicas que consiguen la agrupación por perfiles similares a nivel de género, especie o subespecie, tras la electroforesis del producto de la PCR. Las técnicas DGGE y TGGE (*denaturing y temperature gradient gel electrophoresis*) agrupan aislados cuyo ADN es variable en su contenido de guanina y citosina (G+C). Estas técnicas conllevan la desnaturalización del ADN mediante un agente desnaturalizante o alta temperatura, en función del contenido de G+C (la doble hélice de ADN está más fuertemente unida con mayor contenido de G+C ya que establecen tres puentes de hidrógeno en lugar de los dos que ocurren entre timina y adenina) (Muyzer, 1999).

Otras técnicas aplican la electroforesis a productos de PCR de fragmentos amplificados al azar (RAPD, *random amplified polymorphisms DNA*) (Di Cello *et al.*, 1997), fragmentos del ADN como el gen ribosómico 16S, como la técnica TP-RAPD (Rivas *et al.*, 2001) y otras amplificaciones que emplean uno o dos cebadores en la PCR para agrupar aislados a nivel intraespecífico (Box-PCR, ERICPCR, rep-PCR; Versalovic *et al.*, 1994; Hulton *et al.*, 1991). La aplicación de estas técnicas se basa en las condiciones de la PCR y en la secuencia de los cebadores iniciadores de la polimerasa.

Otros estudios de poblaciones microbianas realizan una digestión del producto de PCR con enzimas de restricción (RFLP, *restriction fragment length polymorphism*) y su posterior electroforesis, que es aplicable a eucariotas (Osborn *et al.*, 2000).

La técnica ARDRA (*amplified ribosomal DNA restriction analysis*) se ha mostrado útil para la clasificación de grupos de aislados a nivel de especie (Heyndrickx *et al.*, 1996).

Otros estudios han reflejado la utilidad del ADN plasmídico (Hartmann & Amarger, 1991), proteínas (SDS-PAGE, Lowry *et al.*, 1951) o lipopolisacáridos (Tsai & Frasch, 1982), aunque están menos extendidos porque las técnicas basadas en el ADN se han extendido más los últimos años.

El Subcomité de taxonomía de *Rhizobium* (incluido en el Comité Internacional de Sistemática de Procariotas, ICSP) explica las consideraciones generales que hay que seguir para la descripción de rizobios, entre las que incluyen que hay que disponer de tres cepas al menos para la descripción de un nuevo taxón. En la descripción de nuevas especies es obligatoria la secuenciación del gen ribosómico 16S junto a otras técnicas basadas en la PCR como RAPD, RFLP, AFLP (*amplification fragment length polymorphisms*) o la secuenciación parcial del genoma bacteriano. El número de marcadores moleculares precisados para la descripción taxonómica de las cepas ha de ser adecuado para el nivel taxonómico que se busca. El subcomité propone igualmente el análisis de varias secuencias de genes implicados en el metabolismo celular denominados *housekeeping*, lo que se conoce como MLST (*Multilocus sequence typing*).

En relación a los análisis de las características fenotípicas de los aislados, se considera importante desde el punto de vista del interés ecológico y evolutivo conocer el rango de leguminosas con capacidad para formar nódulos con el rizobio. También su crecimiento a distintas temperaturas, valores de pH, y su capacidad de crecimiento en medios con diferentes fuentes de C y de N. La resistencia a antibióticos es un estudio común en las descripciones de rizobios y en su caracterización. Cuando se trata de describir una nueva especie, además se considera de gran interés la hibridación o reasociación ADN-ADN para estimar los valores de la complementariedad del genoma.

Los estudios que se han llevado a cabo para la caracterización de la biodiversidad de aislados de rizobios van en muchos casos paralelos a estudios de su infectividad y eficiencia de fijación de N en simbiosis con la planta hospedadora propia del aislado.

1.3.2.1. Marcadores moleculares: *inter simple sequence repeats* (ISSRs)

Los ISSRs son marcadores semiarbitrarios amplificados por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a partir de la presencia de un oligonucleótido o *primer* complementario a un microsatélite, diseñado para unirse a los motivos repetidos de di y trinucleótidos (evitando los mononucleótidos presentes en el cloroplasto). Los primeros de ISSRs incluyen un motivo repetido y un par de bases arbitrario en el extremo 3', utilizando un primer a la vez por reacción de amplificación. El nucleótido adicional del extremo 3' permite la amplificación sólo si el primer se une al extremo 5' de un microsatélite; la polimerasa elongará el primer si el nucleótido extra se acopla con el primero del microsatélite. Cuando dos secuencias repetidas se presentan dentro de una distancia amplificable y con una orientación invertida, el decanucleótido complementario puede inducir la amplificación del segmento de DNA intermedio. La molécula generada, con un tamaño particular (peso molecular), se considera un "locus", que representa el segmento de DNA entre los microsatélites. Al analizar electroforéticamente una muestra se genera un patrón característico de productos de PCR de un individuo que se considera una "huella digital genética". El polimorfismo entre individuo de la misma población puede detectarse, ya que el análisis es sensible

a la presencia/ausencia del elemento genómico reconocido por el primer y a la longitud de la secuencia intermedia amplificada (Zietkiewicz *et al.*, 1994).

Las bandas de ISSRs son consideradas marcadores dominantes, en los que el locus se considera dialélico: cada individuo con banda puede ser tanto heterócigo como homócigo dominante, mientras que la ausencia de esa misma banda en otro individuo representa el genotipo homócigo recesivo.

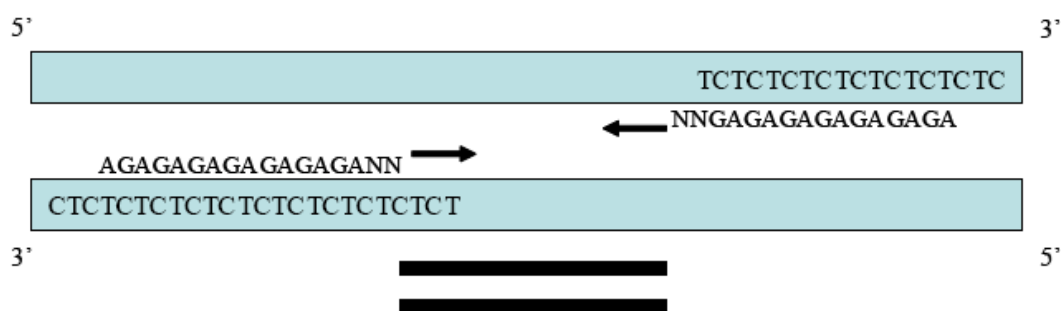


Imagen 36. PCR de los ISSRs: representación esquemática de un solo primer (AG)8 anclado en la terminación 3' con dos nucleótidos (NN), alineado en regiones específicas del ADN templado produciendo bandas claras.

La ausencia de una banda puede deberse a varios factores:

- 1) La no existencia de un sitio de unión completo debido a una mutación.
- 2) Rearreglos estructurales en el cromosoma durante la meiosis.
- 3) Inserciones o deleciones lo suficientemente grandes como para aumentar o disminuir el tamaño de la banda, lo que dificulta identificarlas como un locus separado.

Las ventajas que nos ofrece esta técnica se centran principalmente en la alta variación que detecta, así como en su reproducibilidad, dada principalmente a las altas temperaturas de alineación de la PCR. Además, para diseñar los primeros no es necesario conocer secuencias del genoma del organismo en estudio, por lo que se ha utilizado ampliamente en estudios de variación genética entre individuos muy cercanos y en la identificación de variantes con importancia agrícola (Nagaoka y Ogihara, 1997).

Las desventajas que presentan éste tipo de marcadores genéticos son dos principalmente. La primera se refiere a la seguridad que se pueda tener con respecto a si las bandas del mismo tamaño molecular presentes en varios individuos son homólogas, y la segunda se relaciona con la información incompleta que arrojan dichos marcadores dada la naturaleza dominante, ya que los heterócigos no pueden ser distinguidos.

1.3.2.1.1. Fundamento de la PCR.

La Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) es una técnica "in vitro" que imita la habilidad natural de la célula de duplicar el ADN.

Se trata de una técnica usada para crear un gran número de copias de un segmento de ADN, que utiliza ciclos de desnaturalización, apareamiento con cebadores y extensión por una ADN polimerasa termoresistente.

Hasta la década de 1980, el único método para obtener grandes cantidades de un fragmento de ADN era clonándolo en vectores adecuados e introduciéndolo y multiplicándolo en bacterias. En el año 1985, un investigador norteamericano, Kary Mullis (acreedor del Premio Nobel en Química 1993 por este aporte), desarrolló un método que permite, a partir de una muestra muy pequeña de ADN, obtener millones de copias de ADN *in vitro*, en unas pocas horas y sin necesidad de usar células vivas. Esta técnica, llamada reacción en cadena de la polimerasa (PCR), requiere conocer la secuencia de nucleótidos de los extremos del fragmento que se quiere amplificar. Estas secuencias se usan para diseñar dos oligonucleótidos sintéticos de ADN complementarios a una porción de cada una de las dos cadenas de la doble hélice.

1. La mezcla de reacción contiene la secuencia de DNA que se quiere amplificar, dos oligonucleótidos sintéticos (P1 y P2) que servirán como cebadores, una DNA polimerasa termoestable (Taq) y los cuatro desoxirribonucleótidos trifosfato –dATP, dGTP, dCTP y dTTP–.

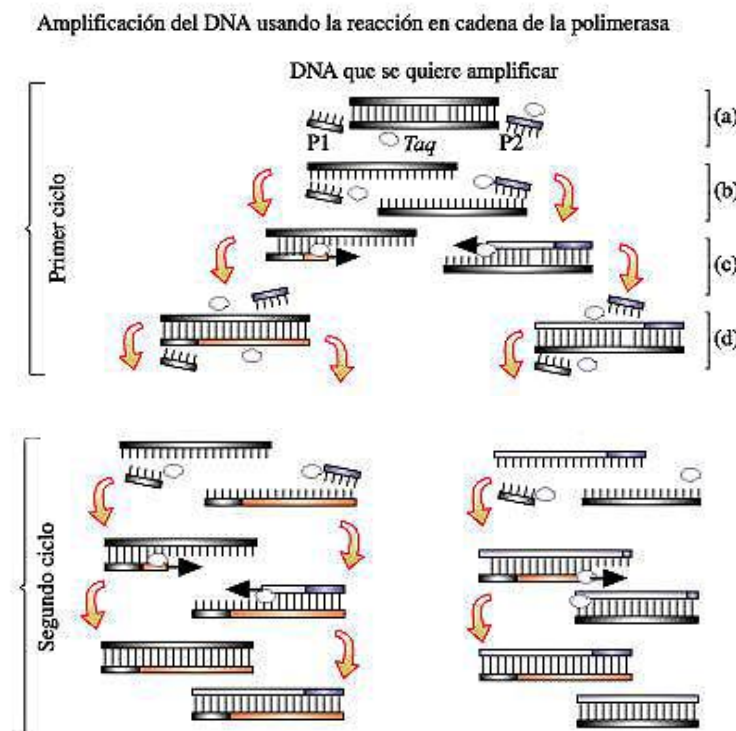


Imagen 37. Fases de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

2. Proceso:

La mezcla de reacción se somete a ciclos sucesivos, cada uno correspondiente a una fase de desnaturalización, una de hibridación o alineación y una de elongación.

a) Durante la desnaturalización, que se realiza por calentamiento de la mezcla a 95°C, se separan las dos cadenas del ADN molde.

b) Durante la hibridación, la temperatura de incubación se reduce para permitir el apareamiento de las bases de ambos cebadores en el sitio donde encuentran una secuencia complementaria.

c) Durante la fase de elongación, la mezcla se calienta a 72°C y la enzima *Taq* ADN polimerasa se usa para replicar las hebras de DNA. La *Taq* polimerasa comienza el proceso de extensión de la cadena complementaria a partir del extremo 3' de los cebadores. Al finalizar cada ciclo, la cantidad de ADN molde disponible para el ciclo siguiente aumenta al doble.

Entre muchas de las aplicaciones que la PCR pone a disposición se encuentran la detección precoz o prenatal de enfermedades genéticas, la detección de infecciones virales latentes o la producción de grandes cantidades de fragmentos de ADN humano a una velocidad muy superior a la posible mediante otros métodos. Esta técnica también se aplica para estudios de identidad y filiación.

1.3.2.2. Secuenciación del ARNr 16S

El ARN ribosómico (ARNr) 16S es la macromolécula más ampliamente utilizada en estudios de filogenia y taxonomía bacterianas. Su aplicación como cronómetro molecular fue propuesta por Carl Woese (Universidad de Illinois) a principios de la década de 1970. Los estudios de Woese originaron la división de los procariotas en dos grupos o reinos: Eubacteria y Archaeobacteria. Además, permitieron establecer las divisiones mayoritarias y subdivisiones dentro de ambos reinos.

Posteriormente, Woese introdujo el término dominio para sustituir al reino como categoría taxonómica de rango superior, y distribuyó a los organismos celulares en tres dominios: Bacteria, Archaea y Eukarya, el último de los cuales engloba a todos los seres eucariotas. Desde entonces, el análisis de los ARNr 16S se ha utilizado ampliamente para establecer las relaciones filogenéticas dentro del mundo procariota, causando un profundo impacto en nuestra visión de la evolución y, como consecuencia, en la clasificación e identificación bacteriana.

Los ARNr 16S pueden caracterizarse en términos de secuencia parcial, mediante el método de catalogación de oligonucleótidos, utilizado en los estudios pioneros de Woese. Siguiendo esta técnica, el ARNr 16S marcado in vivo, y purificado, se trata con la enzima ribonucleasa T1. Los fragmentos generados se separan, determinándose posteriormente la secuencia de todos aquellos que incluyan al menos seis nucleótidos (nt). A continuación, las secuencias de la colección de fragmentos correspondientes a diferentes bacterias se alinean y comparan, utilizando programas informáticos, para calcular finalmente los coeficientes de asociación.

Una vez determinada la secuencia de nucleótidos y establecidas las comparaciones, será el grado de similitud entre las secuencias de los ADNr 16S de dos bacterias lo que indique su relación evolutiva. Además, el análisis comparativo de secuencias permite construir árboles filogenéticos, que reflejan gráficamente la genealogía molecular de la bacteria, mostrando su posición evolutiva en el contexto de los organismos comparados.

Hay que tener en cuenta, no obstante, que es la comparación de genomas completos, y no la comparación de los ADNr 16S, la que aporta una indicación exacta de las relaciones evolutivas. En su ausencia, la especie bacteriana se define, en taxonomía, como el conjunto de cepas que comparten una similitud del 70% o más, en experimentos de reasociación ADN-ADN. Stackebrandt y Goebel demostraron que cepas con este nivel de relación presentan típicamente una identidad del 97% o más entre sus genes ARNr 16S. Así, cepas con menos del 97% de identidad en las secuencias de sus ADNr 16S es improbable que lleguen a estar relacionadas a nivel de especie. Sin embargo, existen cepas que comparten una similitud inferior al 50% en experimentos de reasociación, y son por tanto clasificadas en especies diferentes, pero presentan una identidad del 99-100% a nivel de ADNr 16S. Por ello, en taxonomía, actualmente se recomienda la identificación polifásica, que utiliza criterios fenotípicos junto con datos de secuenciación.

La secuenciación del ADNr 16S constituye un método rápido y eficaz de identificación bacteriana, del cual puede beneficiarse la microbiología clínica, al igual que otras ramas de la microbiología. A medida que los recursos técnicos aumentan, el precio se hace más competitivo, por lo que probablemente su utilización para la identificación sistemática de bacterias patógenas será sólo cuestión de tiempo.

El método molecular de identificación bacteriana mediante secuenciación del ADNr 16S incluye tres etapas: a) amplificación del gen a partir de la muestra apropiada; b) determinación de la secuencia de nucleótidos del amplicón, y c) análisis de la secuencia.

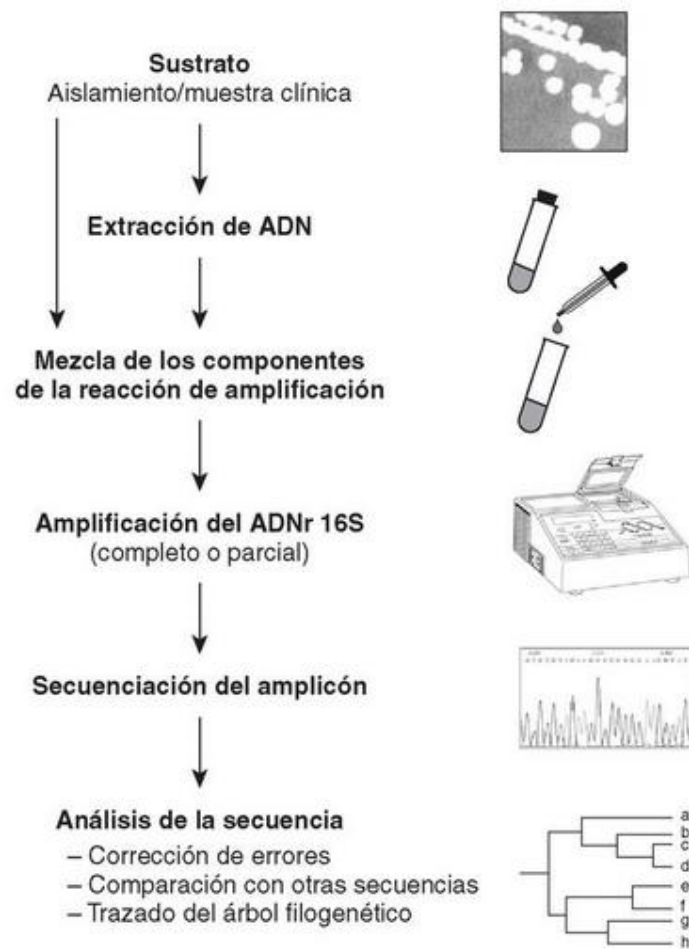


Imagen 38. Etapas a seguir en el proceso de identificación bacteriana mediante secuenciación del ADNr 16S.

Amplificación

La amplificación del ADNr 16S se consigue en un termociclador, gracias a la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Como sustrato se utiliza normalmente ADN purificado a partir de un cultivo puro del agente patógeno. Alternativamente, el ADN podrá obtenerse directamente de la muestra clínica, en el caso de bacterias fastidiosas o no cultivables, cuando aquella proceda de órganos o tejidos normalmente estériles. Para la extracción del ADN bacteriano existen protocolos generales, pero pueden requerirse modificaciones.. Además, la amplificación también puede conseguirse directamente a partir de una colonia aislada o un cultivo líquido de la bacteria de interés, o incluso a partir de una muestra clínica, simplificando significativamente la identificación, al evitar el laborioso proceso de extracción del ADN.

Oligonucleótidos iniciadores

Cuando se pretende amplificar el ADNr 16S prácticamente completo, se utilizan iniciadores diseñados en base a secuencias conservadas próximas a los extremos 5' y 3' del gen, que originan amplicones de 1.500 pb. Se ha demostrado que una identificación precisa no siempre requiere la amplificación, y posterior secuenciación, del ADNr 16S completo. En estas circunstancias se utilizarán oligonucleótidos que permitan la amplificación de fragmentos de menor tamaño, preferentemente los 500 pb correspondientes al extremo 5' del gen. Antes de pasar a la siguiente etapa es conveniente comprobar el producto mediante electroforesis en gel de agarosa, para asegurar la presencia de un único fragmento, amplicón, del tamaño adecuado.

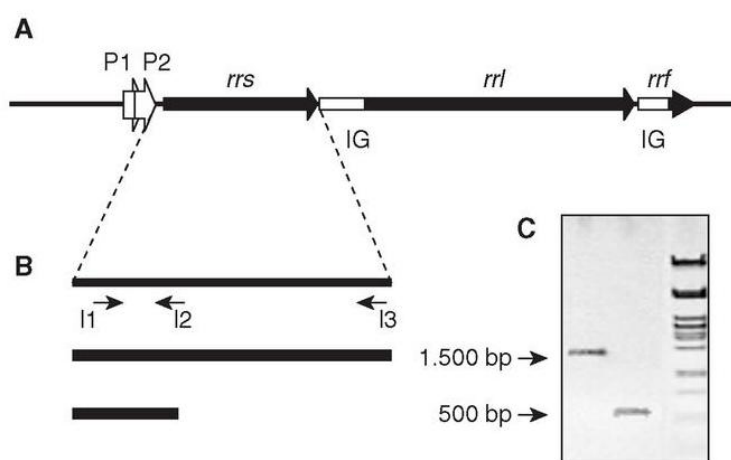


Imagen 39. El operón ribosómico (rmn).

A) Representación esquemática del operón, donde se muestran los genes estructurales de los tres tipos de ARNr (*rrs*, *rrl* y *rrf*), los promotores P1 y P2, y las regiones intergénicas (IG).

B) Estrategia de amplificación del gen *rrs* (ADNr 16S). Se indica la posición de los iniciadores I1 (directo), I2 e I3 (reversos) utilizados para la amplificación (y posterior secuenciación) del gen completo (I1-I3; amplicón de 1500 pb, aproximadamente) o de un fragmento menor (I1-I2; 500 pb correspondientes al extremo 5' del gen; ver explicación en el texto).

C) Visualización de ambos fragmentos por electroforesis en gel de agarosa.

Secuenciación del amplicón

En esta etapa se llevan a cabo las reacciones de secuenciación y el análisis de los productos por electroforesis. Actualmente, se emplea la secuenciación cíclica, en una reacción similar a la de amplificación, que utiliza un único iniciador por reacción y terminadores marcados con fluorocromos adecuados, que interrumpirán la síntesis de manera aleatoria, y facilitarán la detección posterior de los fragmentos interrumpidos.

La disponibilidad de secuenciadores automáticos facilita enormemente la etapa de detección. El número de bases generadas por un secuenciador automático es de 500 a 900, dependiendo del capilar utilizado en la electroforesis. Por ello, para la secuenciación de las dos cadenas del ADNr 16S completo, serán necesarios de 8 a 4 iniciadores, dos de los cuales podrán ser los mismos utilizados en la amplificación. Sin embargo, la secuencia obtenida podrá contener errores y/o presentar posiciones ambiguas (indicadas por N). Por ello, la obtención de la secuencia definitiva requiere la evaluación de los electroferogramas y la alineación de la cadena directa con la reversa, para resolver las posibles discrepancias. Así, aunque la secuenciación de una cadena del amplicón puede conducir a una correcta identificación, la calidad de la secuencia será óptima cuando la comparación de ambas cadenas se utiliza para la corrección de errores.

Generalmente, la secuencia de 500 bases será suficiente para la correcta identificación de un aislado clínico, necesitándose únicamente 2 iniciadores. En cualquier caso, la secuenciación de las dos cadenas del ADNr 16S completo será necesaria a la hora de identificar nuevos patógenos.

Análisis de la secuencia

La última etapa será la comparación de la secuencia del ADNr 16S con las depositadas en bases de datos. Actualmente existen distintas bases de datos, algunas públicas, cuyo acceso es libre a través de internet, como GenBank NCBI (National Center for Biotechnology Information), EMBL (European Molecular Biology Laboratory), RDP (Ribosomal Database Project), RIDOM (Ribosomal Differentiation of Medical Microorganisms), y otras privadas, como MicroSeq (Applied Biosystems) y SmartGene IDNS (Integrated Database Network System).

Finalmente, se podrá construir un árbol filogenético, que refleja, de forma esquemática, el grado de parentesco genético entre las bacterias comparadas.

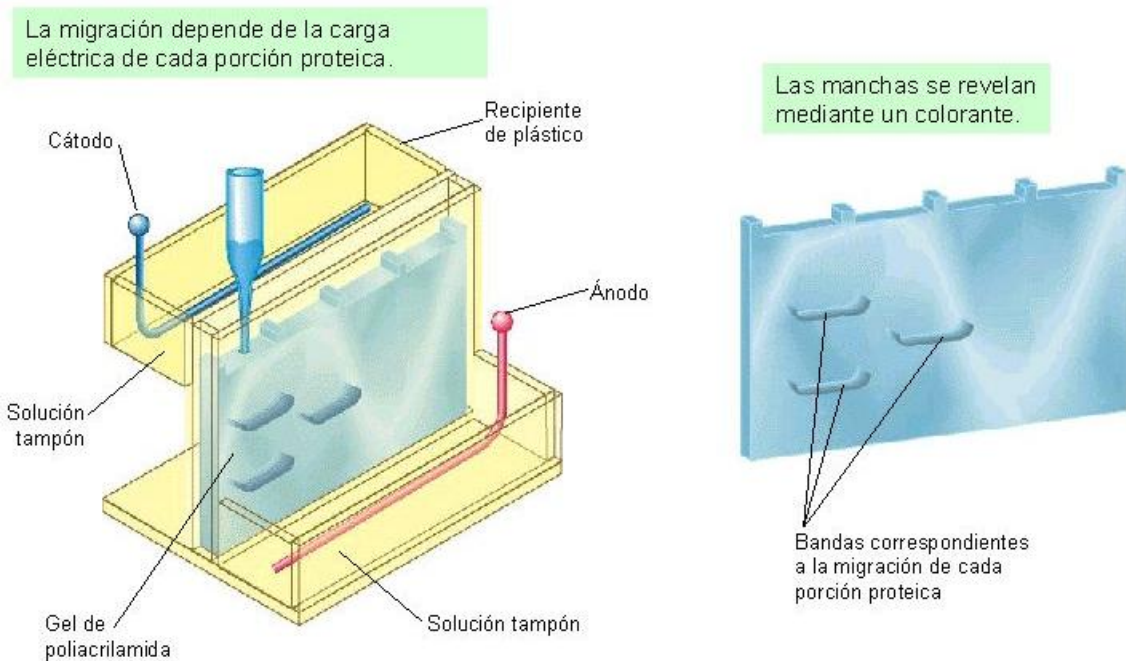


Imagen 40. Electroforesis en gel poliacrilamida

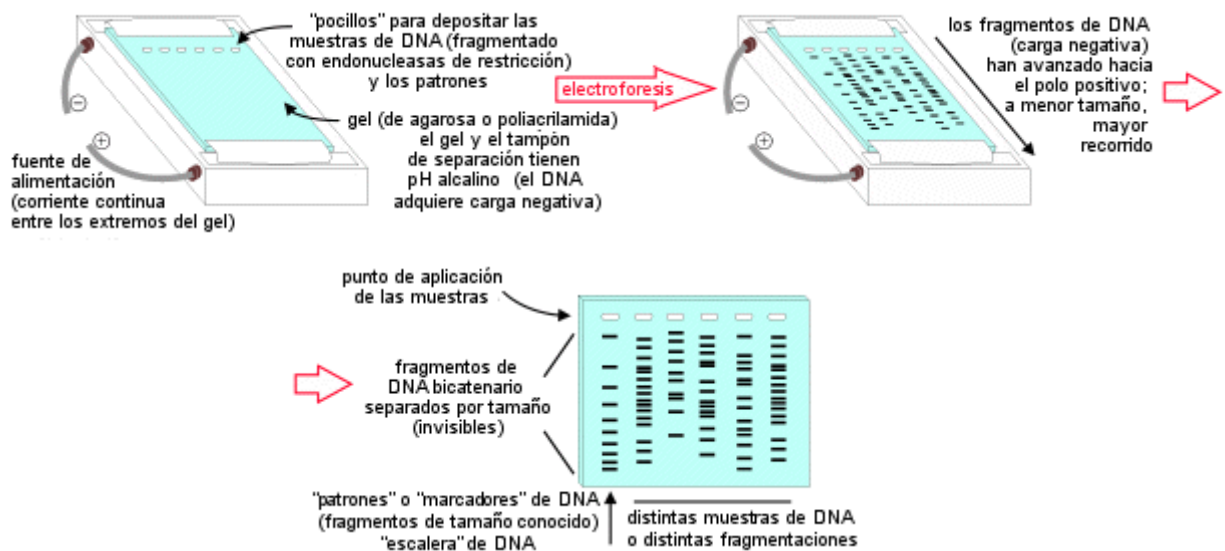


Imagen 41. Separación de DNA en gel de agarosa, electroforesis horizontal submarina.

1.3.3. Marco legal y comercialización de los inoculantes en el mundo

El control de calidad y la regulación de los inoculantes varían entre países. De esta forma, en los EE.UU. o en el Reino Unido este control lo ejerce el fabricante, en otros países se lleva a cabo mediante una organización a la que se adhieren voluntariamente los fabricantes, como Sudáfrica o Australia, o está regulado mediante una institución gubernamental, como en Uruguay o Brasil. Sin embargo, la legislación desfavorable para las patentes de Latinoamérica, por ejemplo la de Brasil o la de México, tiene como consecuencia una inversión privada reducida en investigación y desarrollo de nuevos productos, con lo que la financiación de la investigación está en el sector público (Hungria *et al.*, 2005).

También existen diferencias nacionales en la política de recomendación de cepas para la inoculación. En los EE.UU. cada compañía determina las cepas que empleará en sus productos, mientras que en Mercosur (Argentina, Brasil, Paraguay y Uruguay) los inoculantes deben contener las cepas recomendadas por organismos públicos competentes en esa materia.

El mercado global de los inoculantes se puede dividir en dos sectores (Phillips, 2004). En primer lugar está el sector comercial desarrollado de América, Europa y Australia, dominado por pocos fabricantes, con gran calidad de los inoculantes, que responden a los controles de calidad legislativos o no legislativos de estos países, con gran competencia que presiona a los fabricantes hacia la mejora de la calidad y competitividad (Bullard *et al.*, 2005; Catroux *et al.*, 2001; Lupwayi *et al.*, 2000). En contraste, el sector de los inoculantes para leguminosas en Asia y África es menos sofisticado y más fragmentado, con elevada variabilidad en calidad en los inoculantes y más fabricantes (Lupwayi *et al.*, 2000).

Los retos de los mercados desarrollados de inoculantes son el desarrollo de nuevas tecnologías y productos a nivel de la industria y refinar las prácticas de inoculación a nivel del agricultor, mientras que para el mercado afroasiático los retos están basados en la calidad y en la distribución, extendiendo más su empleo. Por ejemplo, Vietnam produce anualmente alrededor de 700000 ha de leguminosas sin inoculación y a las que se les añaden 50-150 kg N ha⁻¹ en forma de fertilizantes (Herridge, 2005).

No obstante, a nivel internacional sería interesante la liberalización de los mercados y en especial el desarrollo de entidades o asociaciones a nivel internacional que delimiten unos estándares de producción y calidad que homogenicen y estandaricen las normas de producción y calidad de los inoculantes (Phillips, 2004), para conseguir una mejor imagen de este producto para los agricultores.

1.3.4. Marco legal de los inoculantes en España

En España no existen plantas fabricantes de inoculantes a nivel industrial, y hasta los años 90 del siglo XX se venían elaborando lotes reducidos para cubrir una demanda muy baja en el Centro IFAPA Las Torres-Tomejil (Alcalá del Río, España) (Rodríguez-Navarro *et al.*, 2009).

La legislación española no establece listas de microorganismos admitidos para su empleo como inoculantes ni define el control de calidad de los inoculantes comercializados en España. El Real Decreto 824/2005 (España, 2005) sobre productos fertilizantes desarrolla directivas europeas y amplía la legislación nacional sobre estos productos, sin mencionar el término microorganismo en ningún apartado, al igual que sus modificaciones posteriores con el Real Decreto 1769/2007 (España, 2008a) ni con la Orden APA/863/2008 (España, 2008b); ambas están en revisión desde el 2011.

La Ley 43/2002 de sanidad vegetal (España, 2002) tampoco recoge el empleo de microorganismos como inoculantes, aunque en este caso ampara el empleo de microorganismos considerándolos sustancias activas (las sustancias o microorganismos, incluidos los virus, que ejerzan una acción general o específica contra las plagas o en vegetales, partes de vegetales o productos vegetales) para el control biológico.

No obstante, la Directiva 1991/414/CEE del Consejo (Consejo de las Comunidades Europeas, 1991) que regulaba la comercialización de productos fitosanitarios fue modificada posteriormente por la Directiva 2001/36/CE de la Comisión (Comisión de las Comunidades Europeas, 2001) incluyendo nuevos apartados en los que se regulan los productos fitosanitarios cuya sustancia activa sea a base de microorganismos, por tanto sólo esta directiva recoge la regulación de los productos fitosanitarios a base de microorganismos, principalmente orientando los requisitos legislados en materia de sanidad. La Directiva 2009/128/CE (Parlamento Europeo y Consejo, 2009) establece el marco de la actuación comunitaria para conseguir un uso sostenible de los plaguicidas, sin que mencione tampoco ningún aspecto relacionado con microorganismos.

En España, el Ministerio de Medio Ambiente, Rural y Marino de España (MARM) mantiene el Registro de Productos Fitosanitarios (Ministerio de Medio Ambiente, Rural y Marino, 2007) y existe una serie de sustancias activas reconocidas y registradas como fitosanitarios (Sustancias activas de Productos Fitosanitarios) aceptadas, excluidas y en revisión comunitaria a 22 de marzo de 2010. En estas listas aparecen microorganismos reconocidos como bioinsecticidas o fungicidas, como *Bacillus thuringiensis*, *Pseudomonas*, *Trichoderma* o *Streptomyces*, así como una lista de sustancias activas en fase de evaluación, entre las que aparecen también *Pseudomonas* sp. y *Trichoderma* sp. con acción fungicida. También el MARM presenta el registro de OCB (organismos de control biológico, que sólo contempla macroorganismos) y OMDF (otros medios de defensa fitosanitaria), que contempla bacterias como *Azotobacter* y hongos micorrízicos (Ministerio de Medio Ambiente, Rural y Marino, 2007a; 2007b).

Por lo tanto, en la actualidad no existe un registro oficial donde aparezcan los inoculantes comercializados en España, aunque es posible que muy pronto exista una normativa que regule los productos que en la actualidad están apareciendo y difícilmente encajan en las clasificaciones establecidas por el MARM, como es el caso de *Azotobacter* fijadora de N en Otros Medios de Defensa Fitosanitaria.

1.3.5. Tendencias en la investigación y el desarrollo de inoculantes

El Centro para los Estudios de *Rhizobium* (CRS, Perth, Australia) ha llevado a cabo durante años la selección de cepas orientadas al desarrollo de inoculantes en Australia, con un programa de selección de cepas descrito por Howieson *et al.* (2000) en cuatro fases:

- Fase 1: Colección de germoplasma de la población de rizobios del suelo y su mantenimiento como liófilos
- Fase 2: Experimentos en invernadero para validar la infectividad y eficiencia de fijación de N de los aislados
- Fase 3: Valuación de las cepas de élite a partir de la fase 2 en experimentos de campo en 2-3 años, así como evaluación de su supervivencia en ausencia de la planta hospedadora
- Fase 4: Experimentos por entidades independientes en un amplio rango de ambientes para la confirmación de la fase 3

Este planteamiento sirvió al CRS para la selección de cepas efectivas para *Pisum*, *Lens*, *Vicia* y *Lathyrus*. Este programa busca las características más favorables para estos cultivos en las condiciones edafoclimáticas locales.

Las propiedades no evaluadas de forma rutinaria en esta programación son la aptitud de las cepas para entrar en un proceso de fabricación automatizado, su estabilidad genética, vida útil del inoculante, supervivencia en la semilla y compatibilidad con productos fitosanitarios.

La experiencia australiana ha demostrado que prácticamente todas las cepas son aptas para su industrialización. La estabilidad genética es otro reto más complejo para la investigación en inoculantes. Al menos 19 cepas de inoculantes han variado desde que fueron identificadas o descritas en relación a sus características fenotípicas o simbióticas (McInnes *et al.*, 2005).

La supervivencia en la semilla tras la inoculación ha sido un importante objetivo de las investigaciones recientes, por la variación en las tasas de supervivencia (por ejemplo el 89% en semilla con *Mesorhizobium loti*; Lowther & Patrick, 1995), ya que el establecimiento de las plantas y la nodulación es proporcional a la tasa de supervivencia del inoculante en la semilla.

La cuestión planteada por Herridge (2005) para afrontar el futuro en el desarrollo de inoculantes, tiene las siguientes posibles respuestas:

- Un programa nacional de desarrollo de inoculantes con financiación adecuada, potencialmente externa (FAO o Banco Mundial)
- Una persona o equipo investigador que lidere los programas de investigación y desarrollo, como ha ocurrido en Australia con J.M. Vincent, J. Brockwell, y R.J. Roughley, en Brasil con J. Döbereiner y J.R. Jardim Freire y en los EE.UU. con J. Burton.
- Entrenamiento en las técnicas de producción y control de calidad de inoculantes.
- Investigación y desarrollo en cepas para inoculación, soportes, métodos de producción y de aplicación de inoculantes.
- Programa amplio y duradero para la divulgación y demostración de resultados de la inoculación y sus efectos en la agricultura.
- Un sector privado decidido e involucrado en el mercado de los inoculantes, lo que ocurrirá sólo en el caso de una demanda elevada.

2. OBJETIVOS

El redescubrimiento en 2004 de una pequeña población de *Astragalus nitidiflorus* entorno al *Lugar de Interés Comunitario* “Cabezos del Pericón”, única población conocida a nivel mundial, y su posterior inclusión en el *Catálogo Nacional de Especies Amenazadas* en la categoría de “en peligro de extinción” (Orden MAM/2231/2005, de 27 de junio) exigía la inminente redacción de un Plan de Recuperación, en el que se definiesen las medidas necesarias para eliminar tal peligro de extinción, siendo por consiguiente prioritarias las líneas de investigación que tuviesen esta especie por objeto.

Tras su redescubrimiento, el grupo de investigación de Hortofloricultura Mediterránea de la Universidad Politécnica de Cartagena lleva estudiando la biología y ecología de esta especie en colaboración con la Dirección General de Medio Ambiente de la Comunidad Autónoma de la Región de Murcia.

Debido que el escaso reclutamiento de nuevos individuos condiciona la supervivencia de la población, han sido necesarios estudios sobre el éxito reproductivo de la especie así como de los factores bióticos y abióticos que condicionan el establecimiento de nuevos individuos. Factores bióticos como la nodulación de las plantas con bacterias del género *Rhizobium* podían favorecer el reclutamiento de jóvenes plántulas. De hecho, se observaron la presencia de nódulos radiculares en las plantas de esta especie, que si bien los rizobios se adscriben sin dificultad al género *Rhizobium sp.*, no parecían pertenecer a la típica especie *R. leguminosarum* sino más bien a *R. giardinii*, una especie que no había sido descrita en la nodulación de *A. nitidiflorus*, ni siquiera en el género *Astragalus* (Wei *et al.*, 2003).

Aparte de la conservación de semillas de *Astragalus nitidiflorus* en los bancos de germoplasma de la UPCT y del Centro Regional de la Diversidad Biológica de la Comunidad Autónoma de la Región de Murcia situado en el Valle, se contemplaron la introducción de ejemplares en zonas con características medioambientales similares y que pudieran estar protegidos de cualquier tipo de actuación antrópica que pudiese poner en peligro la supervivencia de la población introducida.

En junio del 2012 fue concedido un proyecto LIFE + de “Conservación de *Astragalus nitidiflorus* en su hábitat potencial en la Región de Murcia”. Los objetivos específicos que pretenden conseguir tras la realización de este proyecto son: disminuir las amenazas que afectan a la población de *A. nitidiflorus*; promover técnicas demostrativas de cultivo de *A. nitidiflorus* en vivero; mejorar el acopio genético y la conectividad entre las poblaciones; incrementar y reforzar las poblaciones existentes; sensibilizar y concienciar a la población sobre la importancia de la conservación y el conocimiento sobre las especies amenazadas y la biodiversidad en general.

Debido a lo mencionado anteriormente, el presente estudio se realizó con el objetivo global de llevar a cabo una selección de rizobios de *Rhizobium giardinii* autóctonos del "Cabezos del Pericón", con capacidad para nodular y fijar N₂ atmosférico en simbiosis con el Garbancillo de Tallante (*Astragalus nitidiflorus*). La selección de estos aislados estuvo basada en su aptitud como potenciales cepas de rizobios empleadas en la fabricación de inoculantes. Para cumplir este objetivo general se establecieron los siguientes objetivos concretos:

- 1) Aislamiento de las bacterias de los nódulos de *Astragalus nitidiflorus*: los nódulos recolectados serán esterilizados y machacados, siendo el contenido cultivado en colonias aisladas mediante técnicas microbiológicas estériles.
- 2) Determinación de la identidad de los microbios mediante caracterización molecular: la identificación será llevada a cabo utilizando secuenciación 16S y siguiendo con el secuenciado del *nodA* y el *nodC* mediante técnicas de aislamiento de ADN, PCR, electroforesis y bioinformática.
- 3) Autenticación de esos microbios como rizobios formadores de colonias: los aislados del punto 1 serán re-inoculados en plántulas de *Astragalus nitidiflorus* creciendo en condiciones estériles de laboratorio. El objetivo es demostrar que esos aislados son capaces de formar nódulos en la planta huésped.
- 4) Optimización del protocolo de inoculación en vivero para mejorar el desarrollo y adaptabilidad de plantas de *A. nitidiflorus* producidas para ser llevadas a campo.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Material vegetal

La obtención de rizobios con capacidad para nodular *Astragalus nitidiflorus* se llevó a cabo a partir de la recolección de semillas en Los Lorenzales, en el término municipal de Cartagena; y posteriormente cultivadas en el vivero de la Escuela Técnica Superior Ingeniería Agronómica de la Universidad Politécnica de Cartagena.

En este ensayo se ha seleccionado de forma aleatoria dos individuos de *Astragalus nitidiflorus* perteneciente de semillas del hábitat mencionado anteriormente.

Los Lorenzales se encuentra localizado en las coordenadas geográficas de latitud 37° 40'25" N y longitud 1° 8'34" W, que corresponde con las coordenadas UTM de latitud 663795 y longitud 4171215.

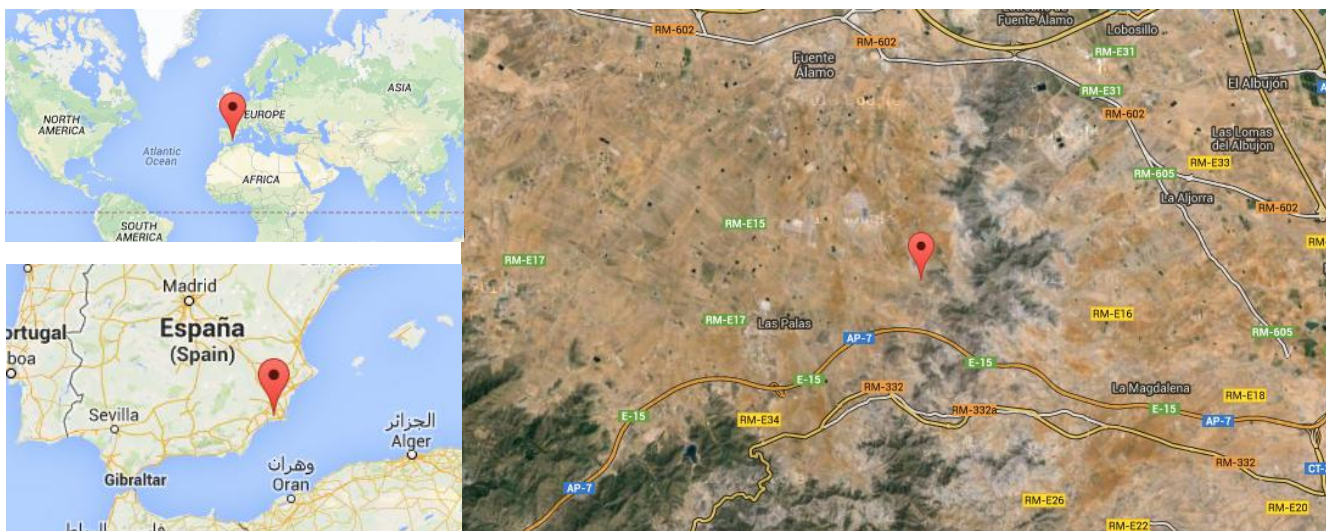


Imagen 42. Distribución geográfica de la población de estudio.

3.2. Método

A continuación se procede a describir la metodología utilizada durante el estudio para el aislamiento de los nódulos, la identificación de rizobios y la inoculación de *Rhizobium* en *Astragalus nitidiflorus* en vivero.

3.2.1. Aislamiento

Para aislar las bacterias del género *Rhizobium*, contenidas en los nódulos de las raíces de las dos plantas de estudio se ha extraído 10 nódulos de cada planta. Posteriormente se ha realizado la limpieza y desinfección de las raíces de las plantas de estudio y de los nódulos.

3.2.1.1. Desinfección de nódulos

Se ha efectuado la limpieza y lavado de la parte radicular con agua teniendo especial cuidado con los nódulos, ya que pueden escindirse fácilmente de la planta.



Imagen 43. (Der.) Planta de *Astragalus nitidiflorus*, (Med.) Limpieza de la parte radicular de la planta, (Izq.) Desinfección de los nódulos.

Consecutivamente se comenzó con la desinfección de los nódulos, sumergiéndolos durante 1 minuto en alcohol al 70%, a continuación se sumergieron durante 4 minutos en una disolución de hipoclorito de sodio (NaClO) al 2% e inmediatamente se realizaron 7 lavados con agua destilada.

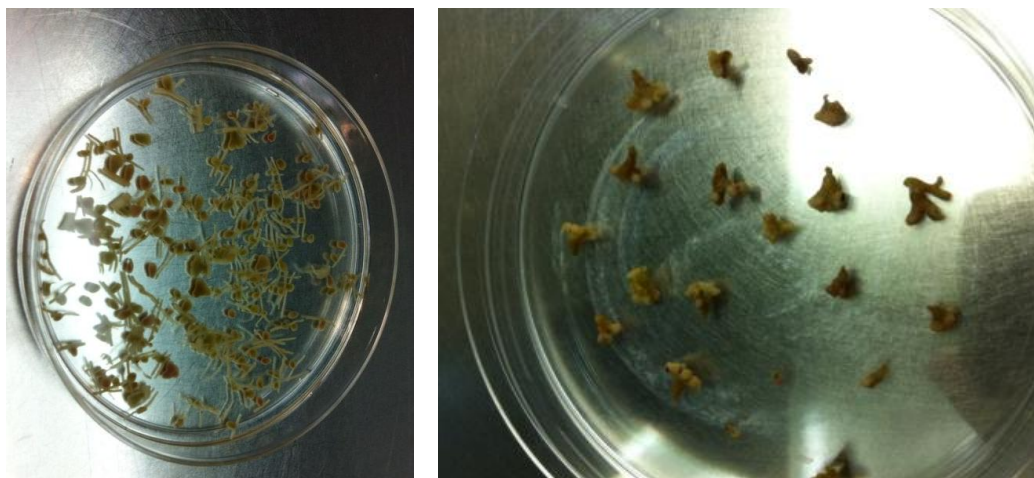


Imagen 44. Nódulos de *Astragalus nitidiflorus* desinfectados.

3.2.1.2. Crecimiento de colonias en medio EL-MARC

Una vez que los nódulos se encontraron desinfectados, se procedió a la siembra de bacterias en placas petri con un medio de agar, con unas características idóneas para el crecimiento de *Rhizobium*.

El medio de cultivo utilizado fue Medio de cultivo EL-MARC (Extracto de Levadura-Manitol-Agar-Rojo Congo), tiene la siguiente composición para la preparación de 1 litro: 15 g de Agar, 1 g de Manitol, 4 g Extracto de Levadura, 0,5 g K_2PHO_4 , 0,2 g $MgSO_4$, 0,1 g NaCl, 10 ml Rojo Congo (81 g / 400 ml H_2O destilada), enrasamos hasta 1 l con agua destilada, y el pH final de $6,8 \pm 0,2$.

Antes de realizar la siembra por estría se machacó los nódulos con ayuda de una varilla. Se seleccionaron 10 nódulos por plantas, para realizar el ensayo. Con cada nódulo obtenido se realizó dos réplicas en placas de Petri con el medio EL-MARC, realizando 20 siembras por planta, es decir, un total de 40 siembras.

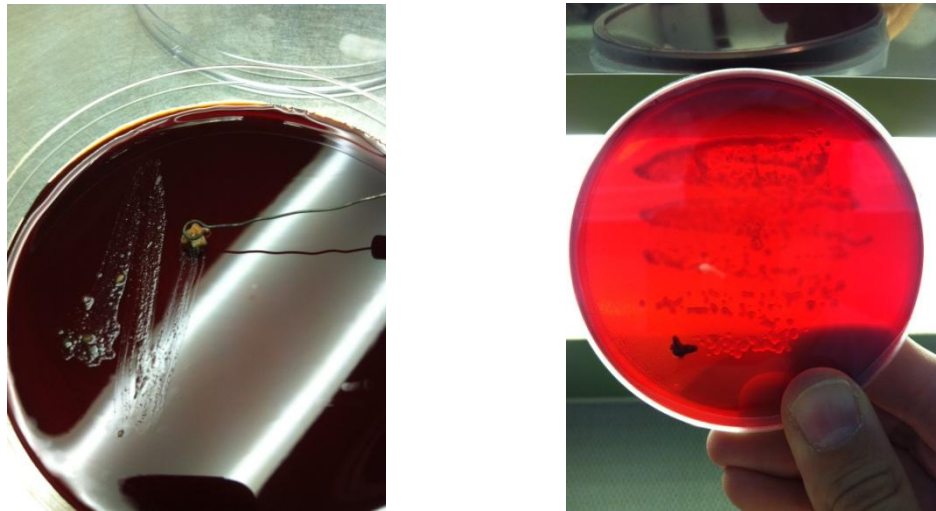


Imagen 45. (Izq.) Realización de la siembra por estría de un nódulo; (Der.) Una placa Petri después de realizar la siembra por estría.

Se incubó a 28°C durante un máximo de 10 a 12 días realizando repiques sucesivos en medio de cultivo LMA (Levadura-Manitol-Agar, con la misma composición que EL-MARC pero sin el Rojo Congo) hasta conseguir cultivos axénicos. Se efectuaron tres replicas con el medio LMA.

Tras la incubación de las placas de Petri mediante el procedimiento de crecimientos de colonias por el medio EL-MARC, las placas que contiene las colonias de rizobios presentan una tensión débil con el Rojo Congo, mientras que las placas de Petri con colonias de muchas otras bacterias adquieren un color más intenso.

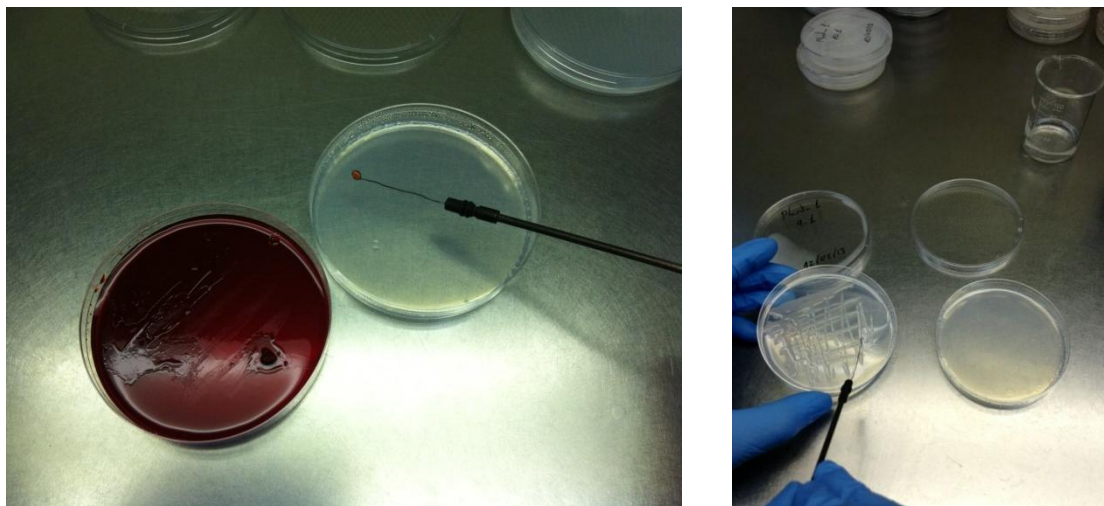


Imagen 46. (Izq.) Placa Petri con positivo en colonia de rizobio; (Der.) Siembra por agotamiento del *Rhizobium*.

3.2.1.3. Crecimiento de colonias en medio Mc-Conckey

Con las placas Petri que dieron positivo al crecimiento bacteriano en el medio de cultivo anterior, EL- MARC, se realizó la siembra por estrías en placas Petri con el preparado comercial del medio Mc-Conckey.

El medio de cultivo Mc-Conckey, en la preparación de un litro está compuesto por: 17 g de Peptona, 3 g de Pluripeptona, 10 g de Lactosa, 1,5 g mezcla de sales biliares, 5 g de Cloruro de sodio (NaCl), 13,5 g de Agar, 0,03 g de Rojo neutro, 0,001 g Cristal violeta y pH final debe de ser $7,1 \pm 0,2$.

Se realizo una incubación a 28°C durante 48 horas. Posteriormente, se seleccionaron las colonias con coloración amarillenta que no son capaces de fermentar el azúcar lactosa (lac⁻) descartando las que presentan coloración violeta.

Debido a que las bacterias capaces de fermentar lactosa producen un cambio en el pH del medio por la liberación de productos ácidos, como consecuencia sus colonias aparecen de color violeta, contrastando con la coloración amarillenta de las colonias de bacterias no fermentadoras de lactosa.



Imagen 47. Placas petri con el medio McConckey.

3.2.1.4. Crecimiento de colonias en medio Kligler

Se realizó una siembra en profundidad por picadura y superficial por estrías en tubos con preparado comercial del medio Kligler con las placas que podrían ser *Rhizobium*, es decir, las colonias de rizobios que no fermentadoras de lactosa.

La composición del medio Kligler para la preparación de un litro es de 13 g de peptona de carne, 5 g de cloruro de sodio, 10 g lactosa, 10 g triptéina, 1 g glucosa, 0,5 g citrato de hierro y amonio, 0,3 g de tiosulfato de sodio, 0,025 g rojo de fenol, 15 g de agar, enrasamos hasta 1 l con agua destilada, y el pH final de $7,3 \pm 0,2$.

El medio de cultivo usado para la diferenciación de enterobacterias, Kligler, se basa en la fermentación de glucosa y lactosa, y a la producción de ácido sulfhídrico.

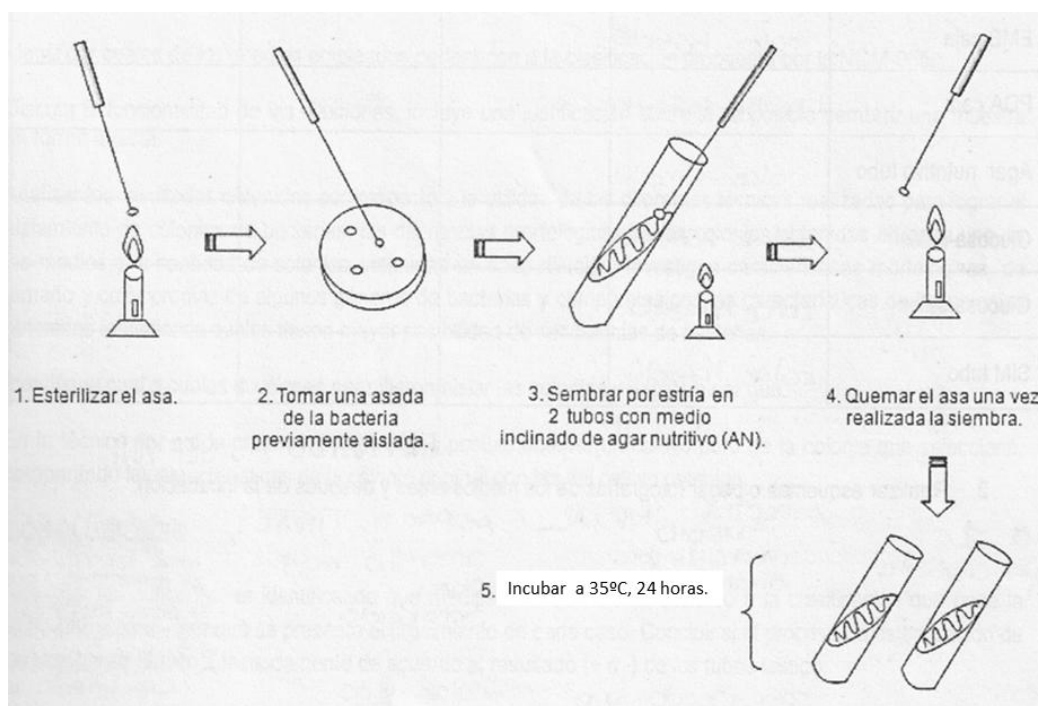


Imagen 48. Procedimiento de siembra por estría en tubos de ensayo.

Se incubó a 35°C durante 24 horas.

Las respuestas a la incubación en este medio de cultivo Kligler pueden ser:

- Superficie roja / Fondo amarillo: bacteria sólo fermenta glucosa.
- Superficie amarilla / Fondo amarillo: bacteria fermenta glucosa y lactosa.
- Superficie roja / Fondo rojo: bacteria es no fermentadora de azúcares (*Rhizobium*).
- Ennegrecimiento el medio: bacteria produce ácido sulfhídrico.

Por lo tanto, se selecciona los tubos que tras la incubación presentan colonias con superficie y fondo de color rojo, que son posibles *Rhizobium*.

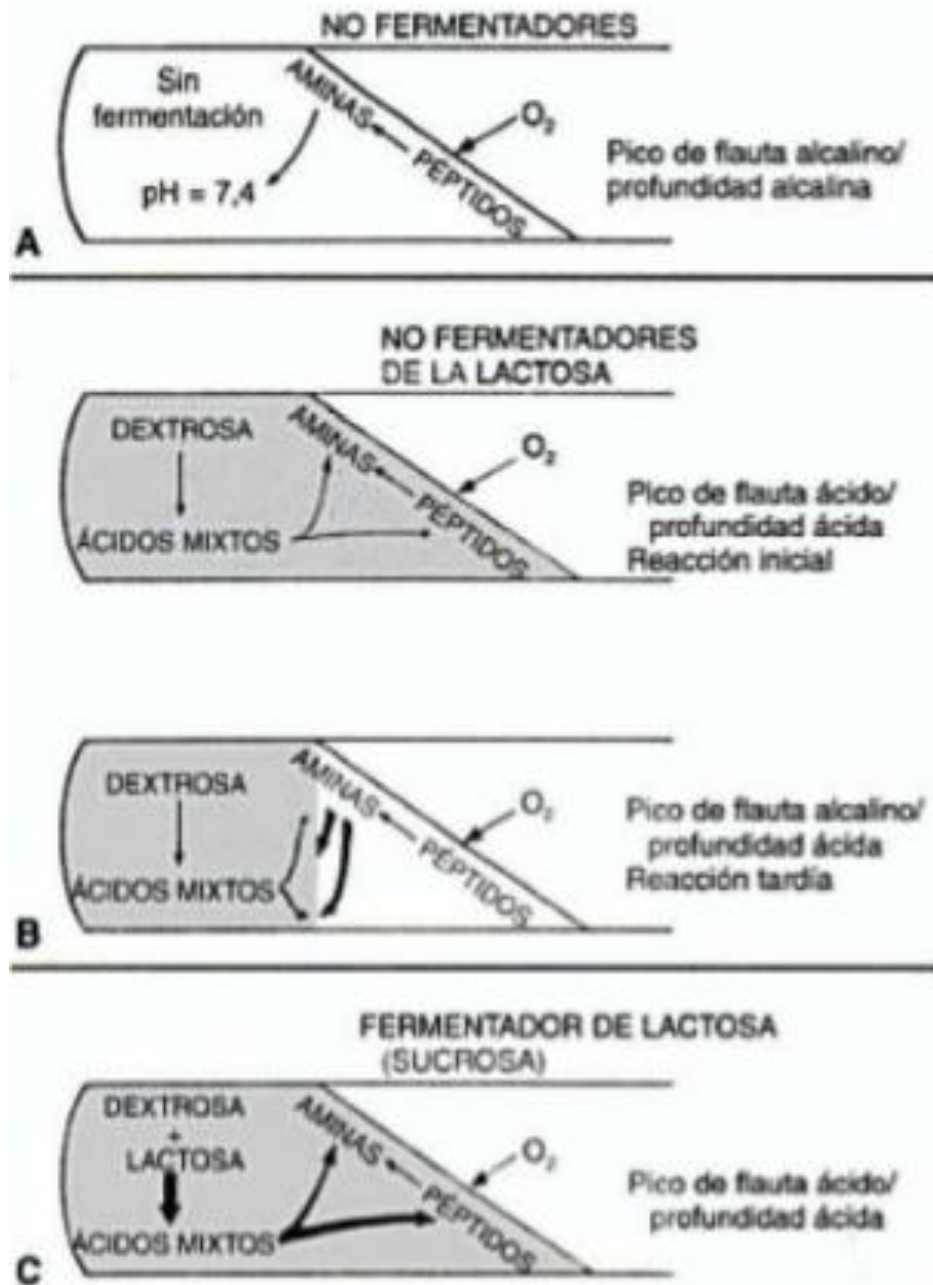


Imagen 49. Tipos de reacciones producidas por las bacterias que crecen en agar hierro de Kligler.

3.2.1.5. Crecimiento de colonias en medio LMA + Azul Bromotimol

Se realizó una siembra superficial por estrías en tubos, a los positivos en el medio de cultivo anterior, con medio LMA (Levadura-Manitol-Agar) + Azul Bromotimol (5 mg/L), este medio de cultivo tiene la siguiente composición para la preparación de 1 litro: 15 g de Agar, 1 g de Manitol, 4 g Extracto de Levadura, 0,5 g K_2PHO_4 , 0,2 g $MgSO_4$, 0,1 g NaCl, 5 ml de Azul Bromotimol, enrasamos hasta 1 l con agua destilada, y el pH final de $6,8 \pm 0,2$.



Imagen 50. Tubos de ensayo con la preparación de crecimiento de colonias en medio LMA + Azul de Bromotimol.

Se incubó a 28°C durante 48 horas. Tras la incubación según el viraje de los tubos de ensayo, se calificó como *Rhizobium* la apariencia de color amarillo del medio que indica presencia de cepas productoras de acidez; y como *Bradyrhizobium* la aparición de color azul del medio que son cepas productoras de alcalinidad.

3.2.2. Identificación

3.2.2.1. Extracción ADN bacterial

Para la extracción del ADN genómico total de cada individuo se realizó con el Kit de extracción "E.Z.N.A. Bacterial DNA kit" de la casa comercial OMEGA. De acuerdo a las instrucciones del fabricante siguiendo el protocolo del método de centrifugación "Kit de ADN bacteriano de E.Z.N.A." de hasta 3 ml con medio de cultivo LB, con una concentración de las muestras es 100 µL de ADN de alta pureza.

Antes de comenzar con la extracción del ADN se preparó el DNA Wash Buffer, HBC Buffer, y la lisozima. Para ello se diluyó el ADN tampón de lavado con etanol al 100% añadiendo 6 ml de D3350-00, 60 ml D3350-0, y 100 ml D3350-02 a cada botella y se almaceno a temperatura ambiente. Se disolvió la lisozima con tampón de elución añadiendo 100 l de D3350 -00, 1 ml de D3350 – 01 y 1 ml de D3350-02 de cada vial y se almaceno a -20°C. Se diluyo el tampón de HBC con isopropanol con el equipo Isopropanol Alta añadiendo 1,6 ml de D3350-00, 10 ml de D3350-01 y 32 ml de D3350-02 se almaceno a temperatura ambiente.

Se cultivó las bacterias en medio LB a fase logarítmica. Se centrifugo 3 ml durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se añado 100 l de tampón TE, se agito con Vortex para resuspender completamente el sedimento, y 10 l de lisozima. Se incubó a 37°C durante 10 minutos.

Se añade a la muestra 25 mg de perlas de vidrio de 1,5 ml tubo de microcentrífuga. Se agitó con Vortex a velocidad máxima durante 5 minutos. Reposó la muestra para permitir que las gotas se asienten. Posteriormente, se transferió el sobrenadante a un nuevo tubo de microcentrífuga de 1,5 ml. Y se añadió 100 ml Buffer BTL y 20 de solución de proteinasa K l. Se volvió agitar con Vortex para mezclar bien y se Incubó a 55°C en un baño de agua con agitación. Después se añadió 5 l de RNasa A y se mezcló. Se realizó la incubación a temperatura ambiente durante 5 minutos. Se centrifugó a 10.000 xg durante 2 minutos para sedimentar cualquier material no digerido. Se transferió el sobrenadante a un nuevo tubo de microcentrífuga de 1,5 ml, sin perturbar el sedimento. Se añadió 220 l de tampón BDL y se agitó con Vortex. Se incubó a 65°C durante 10 minutos. A continuación, se añadió 220 l de etanol 100 % y se agito con Vortex durante 20 segundos a velocidad máxima para mezclar a fondo.

Se insertó un HiBind® Mini Column de ADN en un tubo de recogida de 2 ml y se transfirió la muestra a la columna. Se centrifugó a 10.000 x g durante 1 minuto. Se desechó el filtrado y el tubo de recogida. Después se inserte el HiBind® Mini Column ADN en un nuevo tubo de recogida de 2 ml. Se añadió 500 l Buffer HBC, siendo diluido con isopropanol antes de su uso. Se centrifugó a 10.000 x g durante 1 minuto. Desechar el filtrado y reutilizar el tubo de recogida. Se añadió 700 l de ADN Wash Buffer y se centrifugó a 10.000 x g durante 1 minuto. A continuación, se desechó el filtrado y se reutilizó el tubo de recogida. Se repitió una segunda etapa de lavado Wash Buffer ADN y se centrifugó al vacío ADN HiBind® mini columna a la velocidad máxima, alrededor de 10.000 xg, durante 2 minutos para secar la columna.

Se insertó el HiBind® Mini Column ADN en un nuevo libre de nucleasa tubo de microcentrífuga de 1,5 ml. Se añadió 50 l de tampón de elución calentado 65 ° C a la HiBind® ADN mini columna. Se dejó reposar durante 3 a 5 minutos a temperatura ambiente. Se centrifugó a 10.000 xg durante 1 minuto para eluir el ADN. Se volvió a repetir una segunda etapa de elución y se almacenó el ADN eludió a -20 ° C.

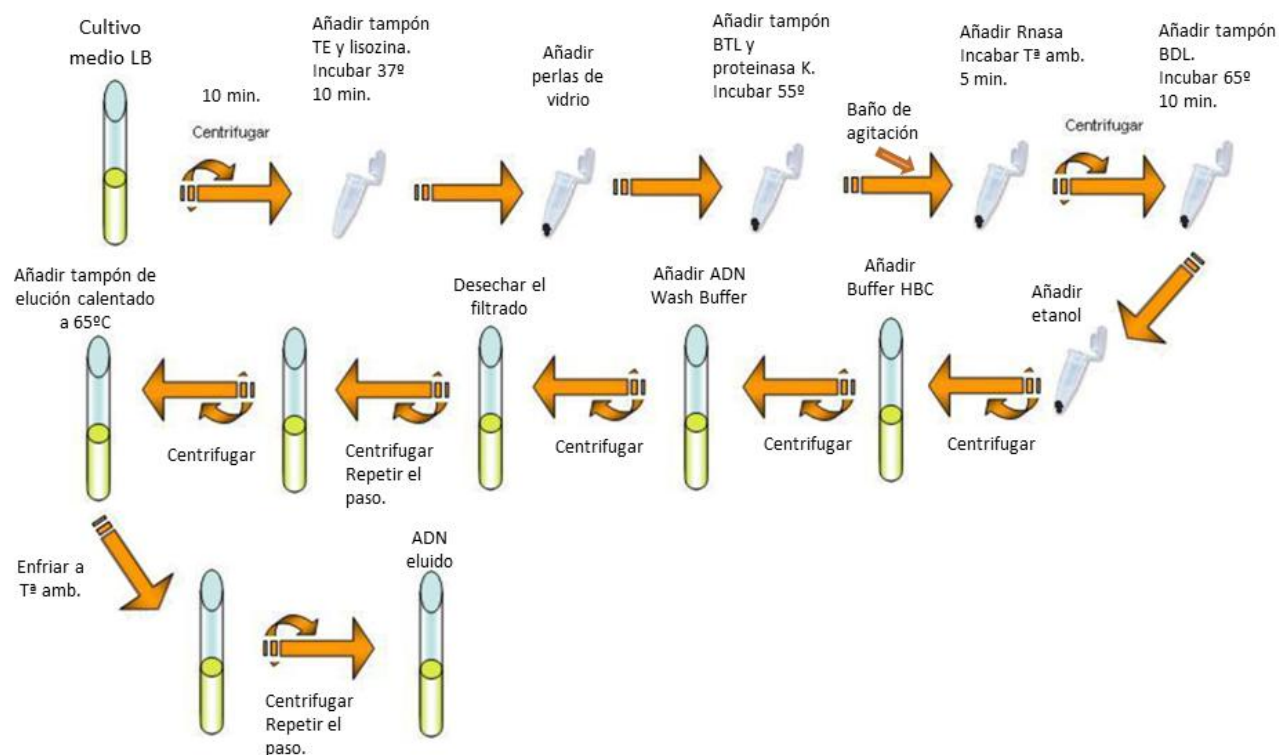


Imagen 51. Extracción del ADN genómico.

3.2.2.2. Amplificación del fragmento perteneciente a la región 16S, nodA y nodC mediante empleo de la PCR.

Se ha generalizado el empleo del gen ribosómico 16S como principal marcador filogenético para identificar especies bacterianas, pero dentro de la familia *Rhizobiaceae* se han observado similitudes tan elevadas que fue necesario requerir nuevos marcadores que afiancen la filogenia obtenida con el gen ribosómico 16S y a su vez tengan mayor exactitud en la identificación (Kwon *et al.*, 2005; Gaunt *et al.*, 2001).

En este estudio se obtuvieron las secuencias del gen ribosómico 16S, los genes fd1 y rD1. También el nodA y nodC (Laguerre *et al.*, 2001) se secuenció con el fin de tener en cuenta el origen de relaciones simbióticas de los aislados con la planta hospedadora. Para llevar a cabo esa secuenciación, se hizo una PCR para la amplificación del fragmento buscado.

El ADN bacteriano se amplificó mediante la técnica de PCR (*polymerase chain reaction*). Esta técnica es empleada tanto para la obtención de perfiles de TP-RAPD como para obtener copias de los fragmentos de ADN que se van a secuenciar posteriormente. De esta forma, la mezcla de reactivos es diferente así como las concentraciones y la naturaleza de los mismos en función del producto final de PCR.

Tabla 4. Reactivos empleados en la PCR.

COMPONENTES	CANTIDAD (μL)
10 x PCR Buffer	2,5
2 mM dNTPs	2,5
25 mM MgCl ₂	2
10 μM forward primer	0,5
10 μM reverse primer	0,5
Taq Polimerasa	0,3
ADN	1
H ₂ O estéril	15,7
	25

Tabla 5. Cebadores para la amplificación de ADN.

Fragmento ADN	Cebador	T _m ^º	100 μM/μl	Secuencia (5'-3')
16S ADNr	fD1	61,0	515	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG
	rD1	60,2	337	AAGGAGGTGATCCAGCC
nodC	nod CF	62,8	490	ACGTAGTCGACGACGGTTC
	nod CFn	67,6	524	AGGTGGTCGACGACGGTTC
	nod C1	71,6	534	CGCGACAGCCAATCGCTATTG
nodA	nod A-1	67,1	525	TGCAGTGGAAAATAAACTGGGAAA
	nod A-2	64,0	547	GGACCGTCATCAAAAAGTCAAGTA

Tabla 6. Condiciones de tiempo y temperatura de PCR.

FASES	TEMPERATURA	TIEMPO	16S
Desnaturalización inicial	95 °C	5 min	
Desnaturalización	95 °C	45 seg	35 ciclos
Elongación	T _a h	45 seg	
Extensión	72 °C	90 seg	
Extensión final	72 °C	7 min	
Conservación	4 °C	∞	

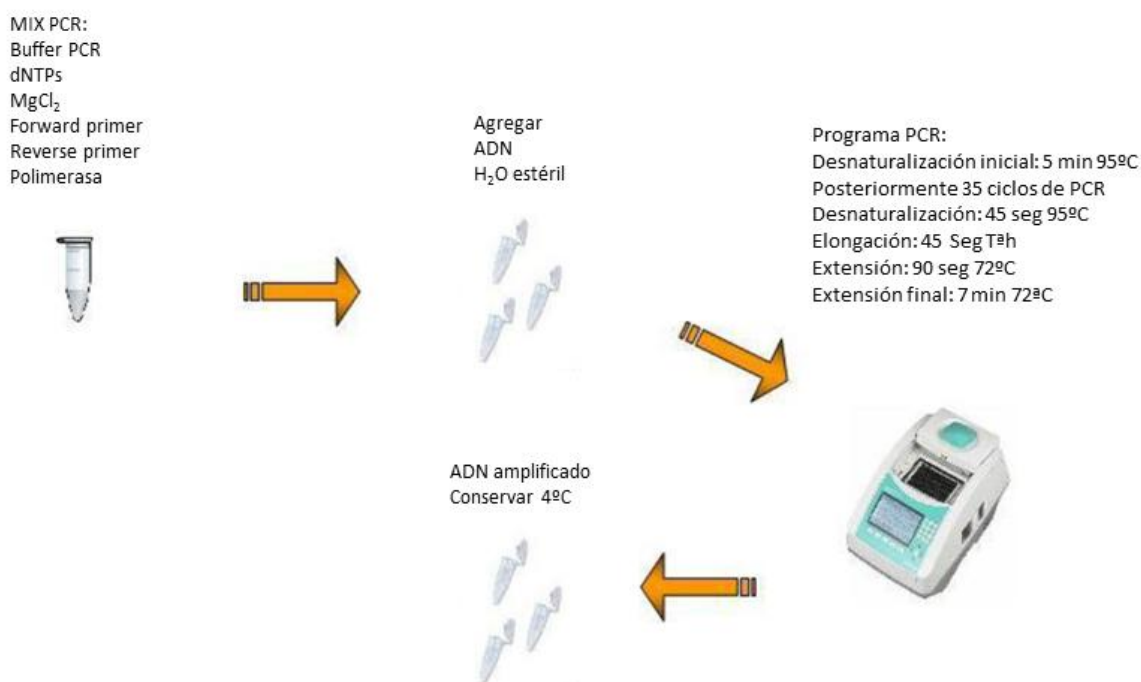


Imagen 52. Protocolo de amplificación del ADN ribosomal 16S, método de la polimerasa en cadena "PCR".

3.2.2.3. Electroforesis del ADN

La concentración de las muestras de ADN se determinó en espectrofotómetro y por electroforesis en gel de agarosa al 1%. Una vez conocida la concentración, todas las muestras se diluyeron a 20 ng/μl para su utilización en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Se pesó 2,5 g de agarosa y se colocó dentro de un envase de vidrio que contenga 250 mL de Buffer TBE 0,5X y se calentó en el microondas durante dos minutos. Se sacó del microondas, se agitó y se volvió a calentar durante otro minuto. Cuando la solución de agarosa alcanzó una temperatura soportable por la mano, se agregó 2,5 μl de Bromuro de Etidio (Solución madre 10 mg. mL⁻¹). Se mezcló bien, agitando el recipiente en forma circular, evitando que se formen burbujas en la solución.

Posteriormente se echó en la solución en la bandeja de corrida vertiendo la solución lentamente por uno de los extremos de la bandeja y se retiró las burbujas que quedan sobre el área de corrida de las muestras con una punta limpia. Se dejó polimerizar la agarosa.

Se llenó el tanque de la cámara de electroforesis con Buffer TBE 0,5X hasta cubrir el gel. Se conectó los electrodos de la cámara a la fuente de poder, graduó el voltaje y se inició para que corriesen las muestras.

A 25 μ L del producto de PCR obtenido se le añadieron 8 μ L del tampón de carga (40% sacarosa y 0,05% azul de bromofenol).

La electroforesis se llevó a cabo durante dos horas aplicando un campo eléctrico de 6 V/cm y utilizando una fuente eléctrica Power PAC 300 (Bio-Rad, EE.UU.).

Los geles se tiñeron con una disolución de bromuro de etidio (Sigma, EE.UU.), de 0,5 μ g mL⁻¹, durante 30 minutos y se fotografiaron con luz ultravioleta utilizando el equipo Gel Doc 2000 (Bio-Rad, EE.UU.).

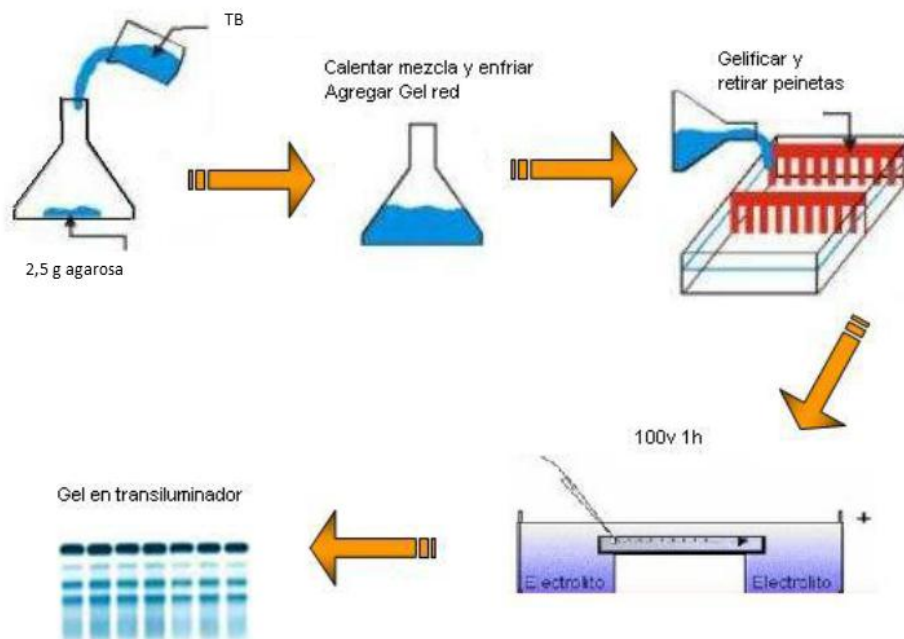


Imagen 53. Protocolo preparación del gel de agarosa al 1,5%.

3.2.2.4. Purificación del fragmento amplificado.

Siguiendo el protocolo "QIAquick PCR Purification Kit" de QIAGEN. Para el procedimiento de Purificación de PCR se añadió 5 volúmenes de tampón PB a 1 volumen de la muestra y la mezcla de PCR. Aunque no era necesario para eliminar el aceite mineral o kerosene, se eliminó para obtener un ADN más limpio. Se añadió 500 μ L de tampón PB de 100 μ L de muestra de PCR, y se comprobó el pH era de 5,0 y que el color de la mezcla era amarillo. Si no se hubiera tenido que añadir 10 μ L de 3 M de acetato de sodio.

A continuación, se colocó una columna de centrifugación QIAquick en un tubo de recogida de 2 ml provisto. Para unirse al ADN, aplicar la muestra a la columna QIAquick y se centrifugó durante 60s y se desechó el filtrado. Se puso la columna QIAquick de vuelta en el mismo tubo. Para lavar, se agregó 0,75 ml de tampón PE a la columna QIAquick y se centrifugó durante 60s. Se desechó el filtrado, se descartó el etanol y se colocó la columna de nuevo QIAquick en el mismo tubo. Y se volvió a centrifugar la columna durante 1 min.

Posteriormente, se colocó la columna QIAquick en un tubo de microcentrifuga de 1,5 ml limpio. Para eludir el ADN, se añadió 50 l de tampón EB (10 mM de Tris · Cl, pH 8,5) o agua (pH 7,0 a 8,5) a el centro de la membrana QIAquick y se centrifugó la columna durante 1 min. Alternativamente, para el aumento de la concentración de ADN, se agregó 30 l de tampón de elución el centro de la QIAquick membrana, se dejó reposar la columna durante 1 min, y luego se centrifugó.

Al ADN purificado se analiza en un gel, se añadió 1 volumen de colorante de azul de bromofenol de carga a 5 volúmenes de ADN purificado.

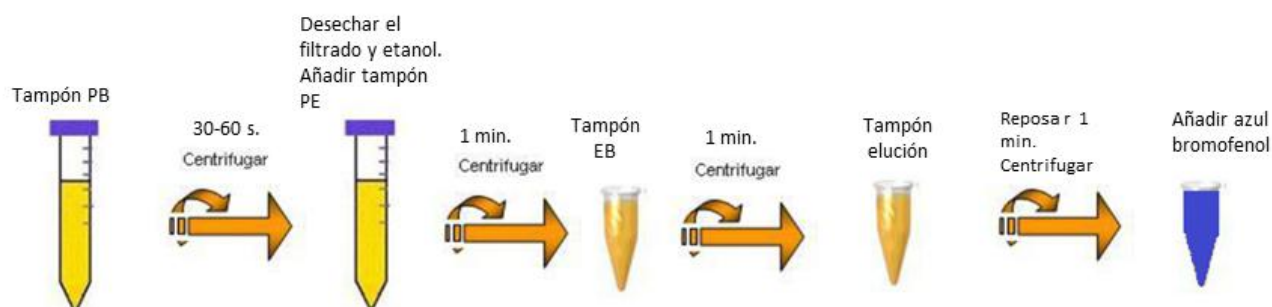


Imagen 54. Purificación del fragmento amplificado.

3.2.2.5. Secuenciando del fragmento amplificado.

Se ha encargado de ello la empresa especializada Savia Biotech, S.A. Empresa que cuenta con las metodologías más avanzadas del análisis de ADN / ARN, diagnóstico genético, fitopatología e "in vitro" de cultivo de células / tejidos se han aplicado en Savia Biotech Laboratorios.



Imagen 55. Secuenciador

3.2.2.6. Introducción de la secuencia en la base de datos BLAST.

BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) es un programa informático de alineamiento de secuencias de tipo local, ya sea de ADN, ARN o de proteínas. El programa es capaz de comparar una secuencia problema (secuencia *query*) contra una gran cantidad de secuencias que se encuentren en una base de datos. BLAST es capaz de calcular la significación de sus resultados, por lo que nos provee de un parámetro para juzgar los resultados que se obtienen. Por lo tanto, este programa permite determinar a qué organismo pertenece la secuencia introducida.

BLAST® Basic Local Alignment Search Tool

Home Recent Results Saved Strategies Help

NCBI/ BLAST/ blastn suite

blastn blastp blastx tblastn tblastx

Enter Query Sequence

Enter accession number(s), gi(s), or FASTA sequence(s) Clear Query subrange

From To

Or, upload file Choose File No file chosen

Job Title

Enter a descriptive title for your BLAST search

☐ Align two or more sequences

Choose Search Set

Database ☐ Human genomic + transcript ☐ Mouse genomic + transcript ☒ Others (nr etc.):

Nucleotide collection (nr/nt)

Organism Optional

Enter organism name or id—completions will be suggested ☐ Exclude +

Enter organism common name, binomial, or tax id. Only 20 top taxa will be shown

Exclude Optional

☒ Models (XM/XP) ☒ Uncultured/environmental sample sequences

Entrez Query Optional

Enter an Entrez query to limit search

Program Selection

Optimize for

☐ Highly similar sequences (megablast)

☐ More dissimilar sequences (discontiguous megablast)

☒ Somewhat similar sequences (blastn)

Choose a BLAST algorithm

BLAST

Search database Nucleotide collection (nr/nt) using Blastn (Optimize for somewhat sim

☐ Show results in a new window

Imagen 56. BLAST (Basic Local Alignment Search Tool).

3.2.3. Inoculación

3.2.3.1. Desinfección de semillas

Para la desinfección de las semillas de *Astragalus nitidiflorus*, se realizó el mismo procedimiento de desinfección que se ha utilizado para los nódulos. Se sumergieron las semillas durante 1 minuto en alcohol al 70%, a continuación se anegaron durante 4 minutos en una disolución de hipoclorito de sodio (NaClO) al 2% e inmediatamente se realizaron 7 lavados con agua destilada.

3.2.3.2. Escarificación y germinación de semillas

La escarificación se realizó mediante un corte superficial con ayuda del bisturí. Posteriormente, se estacionaron las semillas en placas Petri con dos capas de papel de filtro humedecidas y selladas con PARAFILM. Para la germinación de las semillas se colocaron en la cámara de cultivo a la temperatura con 20-12 °C y con un fotoperiodo de 12 horas.

3.2.3.3. Desinfección de turba

La desinfección se efectuó mediante un proceso de deshidratación, durante el cual se realizó un tamizado y colocación de la turba en estufa a 60 °C durante 2 a 3 días.

3.2.3.4. Preparación del inóculo

Para preparar el inóculo se trabajó en campana de flujo laminar. Se realizó la siembra mediante agotamiento del asa de cultivos base de *Rhizobium* a placas Petri con medio de cultivo adecuado, ELM, para el desarrollo del mismo. Se estacionaron las placas Petri selladas con PARAFILM en incubadora a 26 °C durante 3 a 4 días.

Preparación de ELM (Extracto Levadura Manitol), como se ha mencionado anteriormenr, tiene la siguiente composición para la preparación de 1 litro: 10 g de Manitol, 1 g de Extracto de Levadura, 0,5 g K₂PHO₄, 0,2 g MgSO₄, 0,1 g de NaCl, enrasamos hasta 1 l de agua destilada, y el pH final de 6,8± 0,2..

Autoclavado de medio de cultivo y los tubos. Se vertieron 10 mL de ELM en cada tubo. Con un bisturí se cortó porciones de 1 x 1 cm del cultivo de *Rhizobium* y se introdujeron en los tubos de ensayo. Se sellaron los tubos con algodón y se llevaron a la incubadora durante 72 horas a 90 r.p.m. y 28°C.



Imagen 57. (Izq.) Pipetenado 10 ml de ELM para colocar en los tubos de ensayo; (Der.) Recorte de 1x1 cm de cultivo de *Rhizobium* e introducciendolo en los tubos con el cultivo ELM.

3.2.3.5. Inoculación

Para proceder a la inoculación, primero se puso de la turba en las bandejas forestales y se hidrataron. Posteriormente, se trasplantó las plántulas. Se depositan en cámara de cultivo a 20-12°C y fotoperiodo 12 horas. Transcurridos unos días vertido del inóculo de *Rhizobium* en las bandejas forestales con la turba saturada en agua se comprueba la inoculación.



Imagen 58. Inoculación de *Rhizobium* en una bandeja de cultivo forestal de *Astragalus nitidiflorus*.

4. RESULTADOS

4.1. Aislamiento

Una vez obtenidos los nódulos de las raíces de las plantas de *Astragalus nitidiflorus*, se procede a la desinfección, y al aislamiento de las bacterias del género *Rhizobium*. Para ello se realizaron cuatro pruebas de crecimiento de colonias bacterianas: EL-MARC, McConkey, Kligler y medio LMA+Azul Bromotimol.

4.1.1. Crecimiento de colonias en medio EL-MARC

Los resultados obtenidos después de realizar el crecimiento bacteriano mediante el medio de cultivo EL-MARC ha sido bastante efectivo en la mayoría de la siembra de los nódulos de las dos plantas.

Como se ha mencionado anteriormente, tras la incubación mediante este procedimiento resulta que las placas que contienen las colonias de rizobios, es decir, positivas, presentan una tensión débil con el Rojo Congo; mientras que las placas de Petri con colonias de muchas otras bacterias (negativas) adquieren un color más intenso.

En este ensayo resulta negativas en *Rhizobium* cuatro placas petris, perteneciente todas ellas a la planta dos, correspondiendo a los nódulos dos y cuatro, en ambas replicas (2.1, 2.2, 4.1 y 4.2).

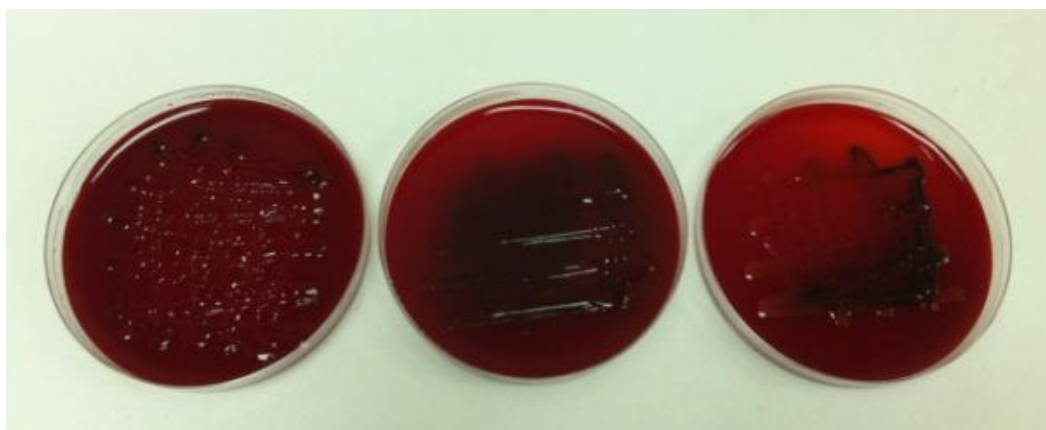


Imagen 59. Resultados del crecimiento de colonias en el medio EL-MARC.

4.1.2. Crecimiento de colonias en medio McConkey

De las placas que han dado positivo en el medio EL-MARC se procedió al crecimiento de colonias en el medio McConkey, obteniéndose mejores resultados en los nódulos de la planta uno que en la dos.

Tras la incubación se seleccionaron las colonias con coloración amarillenta que no son capaces de fermentar el azúcar lactosa (lac^-), por lo tanto, son posibles rizobios; y descartando las que presentan coloración violeta que son las capaces de fermentar liberando productos ácidos. La que tienen un color intermedio o no claramente amarillo son posibles ya que debido a la incertidumbre que nos genera aplicaremos el siguiente medio de crecimiento de colonias para descartarlas o no.

En general, se consigue buenos resultados 18 placas positivas (45%), 8 placas que producen incertidumbre (20%), por lo tanto, 26 placas que son posibles (65%), y el resto dan resultados negativos en Rhizobium.

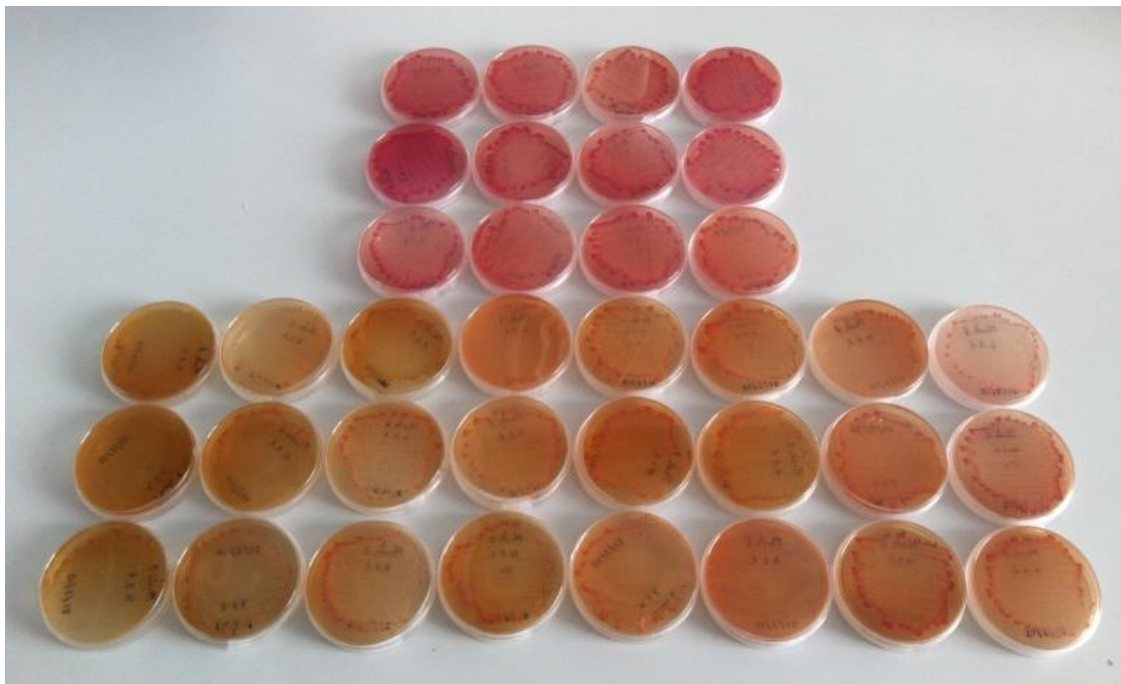


Imagen 60. Placas petri después de la incubación con el medio McConkey.

4.1.3. Crecimiento de colonias en medio Kligler

De las placas que han dado positivo o han provocado incertidumbre en el medio McConkey son posibles en crecimiento en *Rhizobium* se realiza el crecimiento en medio Kligler, del cual se obtienen resultados más desfavorables que los anteriores, aunque es lo esperado ya que cada método empleado es eliminatorio para el siguiente.

Las respuestas a la incubación en este medio de cultivo Kligler pueden ser, como se ha citado anteriormente: ennegrecimiento el medio: bacteria produce ácido sulfhídrico; superficie roja / fondo amarillo: bacteria sólo fermenta glucosa; superficie amarilla / fondo amarillo: bacteria fermenta glucosa y lactosa; y superficie roja / fondo rojo: bacteria es no fermentadora de azúcares, por tanto, positiva, es decir, potencial en *Rhizobium*.

Los resultados logrados son mejores en la planta uno, como en el caso anterior. Se obtienen en total 18 tubos que tras la incubación presentan colonias con superficie y fondo de color rojo, que son posibles *Rhizobium*, es decir, positivos, y 8 tubos que no muestra este aspecto, por tanto, resultan negativos en *Rhizobium*.



Imagen 61. Tubos de ensayo después de la incubación del crecimiento de colonias en medio Kligler.

4.1.4. Crecimiento de colonias en medio LMA+Azul Bromotimol

Tras haber seleccionado los posibles rizobios mediante la experiencia del medio Kligler, se procede al crecimiento de colonias por medio LMA+Azul Bromotimol. Después de la incubación se selecciona los tubos de ensayo que han virado el medio a color amarillo, esto indica la presencia de cepas productoras de acidez, y por tanto, posible *Rhizobium*. No obstante, el de color azul del medio posterior a la incubación indica que son cepas productoras de alcalinidad como *Bradyrhizobium*.

Los resultados obtenidos mediante este estudio coinciden con los alcanzados en la anterior prueba mediante en crecimiento de colonias por el medio Kligler, dando positivo a todos los posibles preseleccionados. Debido a que todos los tubos han virado a color amarillo exceptuando los tubos control. Por tanto, resulta positivos 18 tubos, con posibles cepas de rizobios, referentes a los nódulos 1, 3, 4, 5, 8 y 9 de la planta uno; a las replicas 2.1, 6.2 y 7.2 pertenecientes a la primera planta; y a las siembras 1.2, 5.2 y 10.1 de la planta dos.

En general, sólo se aislaron 18 cepas de colonias de posible rizobios de las 40 siembras de estudio, es decir, 45% de las muestras de estudio han dado positivo, por tanto, son posible *Rhizobium*, para asegurar lo que hemos aislado se procede a la identificación bacteriana.

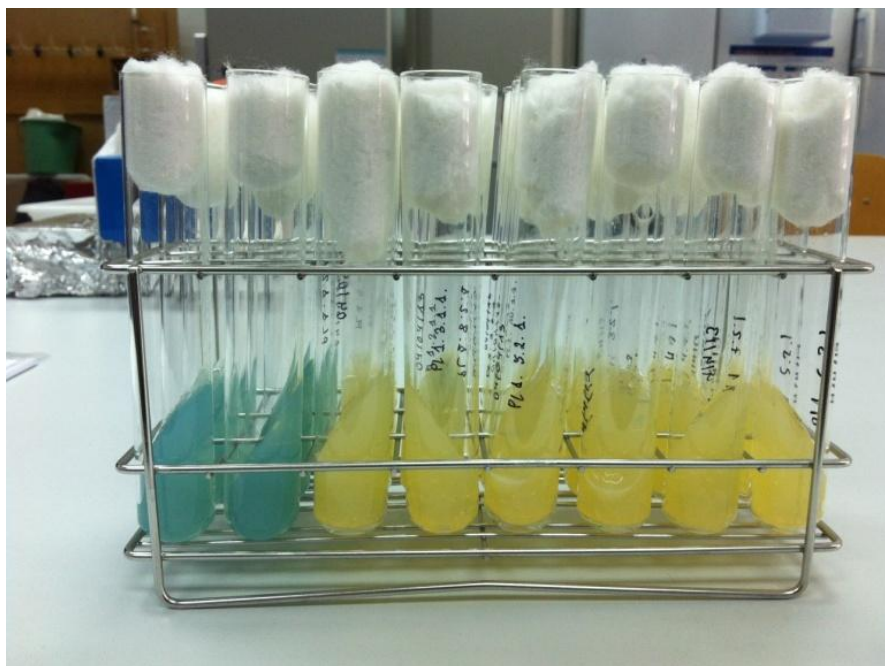


Imagen 62. Tubos de ensayo después de la incubación del crecimiento de colonias en medio LMA + Azul de Bromotimol.

Tabla 7. Resultado de crecimiento bacteriano en los diferentes medios de cultivo.

Planta 1	McConkey	Kligler	LMA+Azul	Planta 2	McConkey	Kligler	LMA+Azul
1.1	(+)	(+)	(+)	1.1	(+)	(-)	
1.2	(+)	(+)	(+)	1.2	(?)	(+)	(+)
2.1	(+)	(+)	(+)	3.1	(-)		
2.2	(+)	(-)		3.2	(-)		
3.1	(?)	(+)	(+)	5.1	(-)		
3.2	(?)	(+)	(+)	5.2	(+)	(+)	(+)
4.1	(+)	(+)	(+)	6.1	(+)	(-)	
4.2	(+)	(+)	(+)	6.2	(-)		
5.1	(+)	(+)	(+)	7.1	(-)		
5.2	(?)	(+)	(+)	7.2	(+)	(-)	
6.1	(-)			8.1	(-)		
6.2	(+)	(+)	(+)	8.2	(+)	(-)	
7.1	(-)			9.1	(-)		
7.2	(+)	(+)	(+)	9.2	(+)	(-)	
8.1	(?)	(+)	(+)	10.1	(?)	(+)	(+)
8.2	(?)	(+)	(+)	10.2	(+)	(-)	
9.1	(+)	(+)	(+)				
9.2	(?)	(+)	(+)				
10.1	(-)						
10.2	(+)	(-)					

Datos:

(+) Positivo

(-) Negativo

(?) Incertidumbre, dudas de los resultados, se realiza el siguiente método de crecimiento.

4.2. Identificación

Para la identificación las colonias potencialmente rizobios, se extrajo el ADN bacterial mediante el protocolo "E.Z.N.A. Bacterial DNA kit", posteriormente la ampliación del fragmento perteneciente a la región 16S rRNA, nodA y nodC mediante empleo de la PCR debido a que los géneros de rizobios se definen sobre la base de la filogenia de estos genes.

Posterior a la ampliación del fragmento 16S, se llevo a cabo la electroforesis del ADN, la purificación del fragmento amplificado, secuenciando del fragmento amplificado e introducción de la secuencia en la base de datos BLAST. Obteniendo como resultado la identificación de la/s especie/s y el grado de coincidencia o autenticidad de la colonias aisladas, como se observa en las tablas 8 y 9.

Como resultados globales de la identificación de las 18 cepas aisladas; seis de las cepas de estudio que presentó una similitud elevada a la especie *Pseudomonas sp.* del 98%, de estas 6 cepas cuatro son pertenecientes a la primera planta correspondientes a los nódulos 1 y 3 en ambas replicas, y las otras dos de la segunda planta corresponde a las colonias 1.2 y 5.2. Cinco de las 18 cepas aisladas de rizobius corresponde a la especie *Rhizobium sp.*, todas ellas pertenecientes a la planta 1, y a las siembras de estudio 2.1, 4.1, 4.2, 6.2, 7.2. Otras cinco cepas conciernen a *Enterobacter sp.*, procedentes de la planta 1 y de los nódulos 3, 9 y a la siembra 8.1. Y la cepa aislada de estudio restante pertenece a la planta dos corresponde con la siembra 10.1 y corresponde a la especie *Erwinia sp.*

Tabla 8. Resultados de identificación de los nódulos de la planta 1.

Planta 1	Especie	Identidad
1.1	<i>Pseudomonas sp.</i>	80%
1.2	<i>Pseudomonas sp.</i>	80%
2.1	<i>Rhizobium cellulosilyticum</i>	82%
	<i>Rhizobium huautlense</i>	82%
	<i>Rhizobium algalisoli</i>	81%
	<i>Rhizobium pusense</i>	79%
3.1	<i>Pseudomonas sp.</i>	98%
3.2	<i>Pseudomonas sp.</i>	97%
4.1	<i>Rhizobium cellulosilyticum</i>	92%
	<i>Rhizobium huautlense</i>	91%
4.2	<i>Rhizobium cellulosilyticum</i>	79%
	<i>Rhizobium huautlense</i>	79%
	<i>Rhizobium pusense</i>	79%
5.1	<i>Enterobacter sp.</i>	92%
5.2	<i>Enterobacter sp.</i>	76%
6.2	<i>Rhizobium pusense</i>	90%
7.2	<i>Rhizobium pusense</i>	86%
8.1	<i>Enterobacter sp.</i>	90%
9.1	<i>Enterobacter sp.</i>	76%
9.2	<i>Enterobacter sp.</i>	85%

Tabla 9. Resultados de identificación de los nódulos de la planta 2.

Planta 2	Especie	Identidad
1.2	<i>Pseudomonas sp.</i>	97%
5.2	<i>Pseudomonas sp.</i>	98%
10.1	<i>Erwinia sp.</i>	90%

Tabla 10. Resultado global de identificación de los nódulos de estudio.

Especie	% Nódulos de P1/ total siembras P1	% Nódulos de P2/ total de siembras en P2	% Total de nódulos/ total de siembras	% Nódulos/ cepas aisladas
<i>Pseudomonas sp.</i>	20	10	15	33,34
<i>Rhizobium sp.</i>	25	-	12,5	27,78
<i>Enterobacter sp.</i>	25	-	12,5	27,78
<i>Erwinia sp.</i>	-	5	2,5	5,56

Datos:

P1: Planta 1

P2: Planta 2

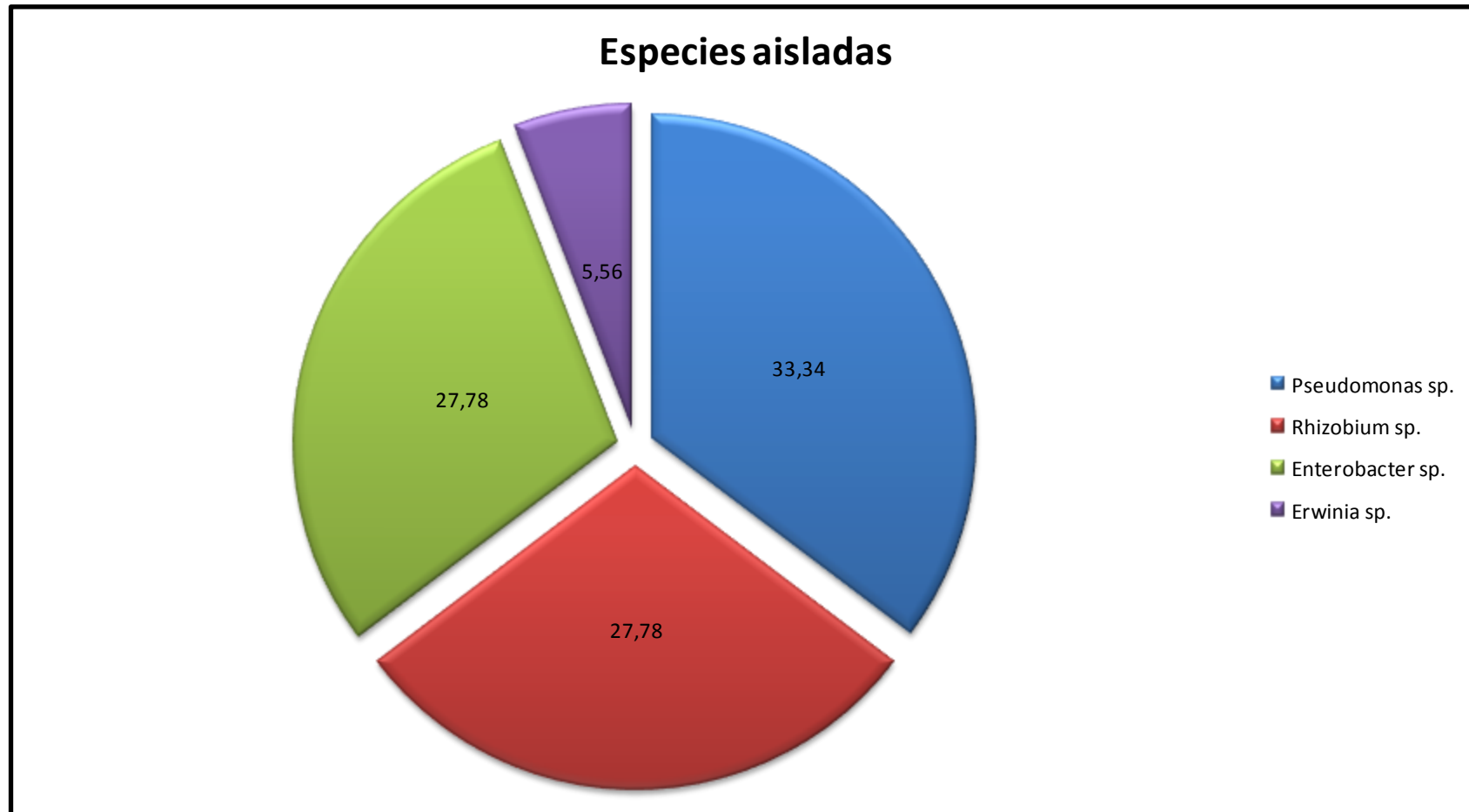


Imagen 63. Gráfica de porcentaje de especies

4.3. Inoculación

Para la inoculación de *Rhizobium sp.* a las plantas de *Astragalus nitidiflorus*, se utilizaron las colonias que anteriormente se habían identificado como potencialmente *Rhizobium sp.*, las correspondientes con las siembras bacterianas: 2.1, 4.1, 4.2, 6.2 y 7.2 todos pertenecientes a nódulos de la planta 1, como se han manifestado en los resultados anteriores.

Se realizaron 12 inoculaciones de plantas por cada cepa de cultivo identificada como *Rhizobium sp.*, obteniendo un total de 60 plantas inoculadas.

Los resultados obtenidos de la inoculación de las plantas *Astragalus nitidiflorus* con *Rhizobium sp.* han sido muy representativos y negativos a la vez, debido a que el 100% de las plantas inoculadas en este ensayo no han conseguido nodular.

5. CONCLUSIÓN

No se ha podido aislar ni identificar la especie de rizobio que infecta las raíces de *A. nitidiflorus* y forma nódulos fijadores del nitrógeno atmosférico.

Sin embargo, si se han conseguido aislar rizobios que pertenecen a cuatro especies del género *Rhizobium sp.*, aunque ninguno de ellos ha desarrollado nódulos de las plantas en el ensayo de inoculación. Esto ha ocurrido en cinco de las dieciocho cepas que se ha conseguido aislar, que corresponde con el 27,78% de cepas aisladas y con el 12,5% de total de las siembras de estudio.

Debido a los resultados obtenidos hasta ahora, se ha buscado colaboración con el Centro de Biotecnología y Genómica de Plantas perteneciente a la U.P.M. e I.N.I.A., para el aislamiento e identificación del rizobio infectivo de *Astragalus nitidiflorus*.

Actualmente, se sigue trabajando en esta líneas de investigación con la esperanza de conseguir plantas de *Astragalus nitidiflorus* inoculadas en vivero, para su posterior repoblación en su hábitat natural, ya que esta planta como se ha mencionado con anterioridad se encuentra "En peligro de extinción".

6. BIBLIOGRAFÍA

- ADDIS, G. (2003). Treatments promotmg germination of *Tavemiera abyssinica* A. Rich.seeds. *Seed Science and Technology*, 31(3): 579-586.
- ADL SM, COLEMAN DC, READ F. 2006. *Slow recovery of soil biodiversity in sandy loam soils of Georgia after 25 years of no-tillagemanagement*. Agriculture, Ecosystems and Environment. 114, 2-4. p. 323-334.
- AIZPURU, I., C. ASEGINOLAZA, P. C ATALÁN & P.M. URIBEEC HEBARRÍA. 1993. Catálogo florístico de Navarra. Informe técnico. Dpto. de Medio Ambiente, Gobierno de Navarra. Pamplona.
- AIZPURU, I., C. ASEGINOLAZA, P.M. URIBE-EC HEBARRÍA, P. URRUTIA & I. ZORRAKIN. 1999. C laves ilustradas de la Flora del País Vasco y Territorios Limítrofes. Servicio C entral de Publicaciones del Gobierno Vasco. Vitoria-Gasteiz.
- ALBAREDA M, RODRÍGUEZ NAVARRO DN, CAMACHO M, TEMPRANO FJ. 2008. *Alternatives to peat as a carrier for rhizobia inoculants: Solid and liquid formulations*. Soil Biology and Biochemistry. 40. p. 2771-2779.
- ALBERTON O., KASCHUK G., HUNGRIA M. 2006. *Sampling effects on the assessment of genetic diversity of rhizobia associated with soybean and common bean*. Soil Biology & Biochemistry. 38. p. 1298–1307.
- ALIEN, O., AND E. K. ALIEN. 1981. *The Leguminosae*. University of Wisconsin press, Madison. Macmillan Publishing Company, London.
- ALLAWAY, D., E. M. LODWIG, L. A. CROMPTON, M. WOOD, R. PARSONS, T. R. WHEELER AND P.S. POOLE. 2000. Identification of alanine dehydrogenase and its role in mixed secretion ammonium and alanine by pea bacteroids. Mol. Microbiol. 36:508-515.
- ALLEN ON, ALLEN EK. 1981. *The Leguminosae*. Macmillan Publishers Ltd. Londres, Reino Unido.
- ALLEN MB, ARNON DI. 1955. *Studies on nitrogen-fixing blue-green Algae. I. Growth and nitrogen fixation by Anabaena cylindrica Lemm*. Plant Physiology. 30. p. 366-372.
- ANDERSSON, L.; MILBERG, P.; SCHUTZ, W. & STEINMETZ, O. (2002). Germination characteristics and emergence time of annual *Bromus* species of differing weediness in Sweden. *Weed Research*, 42(2): 135-147.
- APARICIO, A. (1995). Seed germination of *Erica andevalensis* Cabezudo and Rivera (Ericaceae), an endangered edaphic endemic in southwestem Spain. *Seed Science and Technology*, 23(3); 705-713.

- BAÑARES, A.; BLANCA, G.; GÜEMES, J.; MORENO, J.C. & ORTIZ, S. EDS. (2003). *Atlas y Libro Rojo de la Flora Vascular Amenazada de España*. Dirección General de Conservación de la Naturaleza. Madrid, 1.072 pp.
- BAÑARES, A.; BLANCA, G.; GÜEMES, J.; MORENO J.C. y ORTIZ, S. (ED.) (2004). *Atlas y Libro Rojo de la Flora Vascular Amenazada de España*. Dirección General para la Biodiversidad, Publicaciones O.A.P.N. Madrid. 1069 pp.
- BARNEBY, R. 1964. *Atlas of North American Astragalus*. Memoirs of the New York Botanical Garden 13: 1-1188.
- BÁSCONES E., IMPERIAL J., RUIZ-ARGÜESO T. AND PALACIOS J. M. 2000. Generation of new hydrogen-recycling *Rhizobiaceae* strains by introduction of a novel *hup* minitransposon. *App. Env. Microbiol.* 66: 4292-4299.
- BASHAN Y. 1998. *Inoculants of plant growth promoting bacteria for use in agriculture*. *Biotechnology Advances*. 16, 4. p. 729-770.
- BASKIN, J.M. & BASKIN, C.C. (1998). Greenhouse and laboratory studies on the ecological life cycle of *Dalea foliosa* (Fabaceae), a federal endangered species. *Natural Areas Journal*, 18(1): 54-62.
- BASKIN, CC. & BASKIN, J.M. (2000). Seed germination ecology of *Lesquerella lyrata* Rollins (Brassicaceae), a Federally Threatened Winter Annual. *Natural Areas Journal*. 20(2): 159-165.
- BASKIN, C.C. & BASKIN, J.M. (2003). Seed germination and propagation of *Xyris temesseensis*, a federal endangered wetland species. *Wetlands*, 23(1): 116-124.
- BATISH DR., LAVANYA K., SINGH H.P., KOHLI R.K. 2007. *Phenolic allelochemicals released by Chenopodium murale affect the growth, nodulation and macromolecule content in chickpea and pea*. *Plant Growth Regulation*. 51. p.119-128.
- BATTISTI L., J. C. LARA, AND J. A. LEIGH. 1992. Specific oligosaccharide form of the *Rhizobium meliloti* exopolysaccharide promotes nodule invasion in alfalfa. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 89: 5625-5629.
- BECKER A., AND A. PÜHNER. 1998. Production of exopolysaccharides, p, 97-118. En: H. P. Spaink, A. Kondorosi, and P.J.J. Hooykaas (eds), *The Rhizobiaceae: Molecular Biology of Model Plant-Associated Bacteria*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- BENEDUZI A., PERES D., VARGAS L.K., BODANESE-ZANETTINI M.H., PASSAGLIA L.M.P. 2008. *Evaluation of genetic diversity and plant growth promoting activities of nitrogen-fixing bacilli isolated from rice fields in South Brazil*. *Applied Soil Ecology*. 39, 3. p. 311-320.

- BERNARDELLO, G.; ANDERSON, G.J.; LÓPEZ, P.; CLELAND, M.A.; STUESSY, T.F. & CRAWFORD, DJ. (1999). Reproductive biology of *Lactoris fernandeziana* (Lactoridaceae). *American Journal of Botany*, 86(6): 829-840.

- BON. 1997. Decreto Foral 94/1997, de 7 de abril, de creación del Catálogo de la Flora Amenazada de Navarra y adopción de medidas para la conservación de la flora silvestre catalogada. Gobierno de Navarra.

- BRAMWELL, D. (1987). The role of the Jardín Botánico Canario "Viera y Clavijo" in the conservation of endangered Canarian endemics. In *Botanic Gardens and the World Conservation Strategy*. D. Bramwell, O. Hamann, V. Heywood & H. Synge (eds.), pp. 175- 181. Academic Press, London.

- BROCKWELL J., BOTTOMLEY P.J. 1995. *Recent advances in inoculant technology and prospects for the future*. Soil Biology and Biochemistry. 21. 415. 683-697.

- BROOK, B.W.; O'GRADY, J.J.; CHAPMAN, A.P.; BURGMAN, M.A.; AKCAKAYA, H.R. & FRANKHAM, R. (2000). Predictive accuracy of population viability analysis in conservation biology. *Nature*, 404(6776): 385-387.

- BROWN, E. & KEPHART, S. (1999). Variability in pollen load: implications for reproduction and seedling vigor in a rare plant, *Suene douglasii* var. *oraria*. *International Journal of Plant Sciences*, 160(6): 1145-1152.

- BULLARD G.K., ROUGHLEY R.J., PULSFORD D.J. 2005. *The legume inoculant industry and inoculant quality control in Australia: 1953–2003*. Australian Journal of Experimental Agriculture. 45. p. 127-140.

- BUNGE, A. 1868. Generis Astragali species gerontogae. Pars prior. Claves diagnosticae. Mémoires de l'Académie Impériale des Sciences de Saint Petersburg, ser. VII, 11:1-140.

- BURGE, A. 1869. Generis Astragali species gerontogae. Pars Altera: Species enumeratio. Mémoires de l'Académie Impériale des Sciences de Saint Petersburg, ser. VII, 15:1-254.

- BUTTERY BR, PARK SJ, FINDLAY WJ. 1987. *Growth and yield of white bean (Phaseolus vulgaris L.) in response to nitrogen, phosphorus and potassium fertilizer and to inoculation with Rhizobium*. Canadian Journal of Plant Science 67. p. 425-432.

- BUTTERY BR, PARK SJ, VAN BERKUM P. 1997. *Effects of common bean (Phaseolus vulgaris L.) cultivar and rhizobium strain on plant growth, seed yield and nitrogen content*. Canadian Journal of Plant Science. p. 347-351.

- CABELLO, M.L.; RUIZ, T. & DEVESA, J.A. (1998). Ensayos de germinación en endemismos ibéricos. *Acta Botánica Malacitana*, 23: 53.

- CAMPO R.J., ARAUJO R.S., HUNGRIA M. 2009. *Molybdenum-enriched soybean seeds enhance N accumulation, seed yield, and seed protein content in Brazil*. Field Crops Research. 110. p. 219–224
- CANWEST MEDIAWORKS PUBLICATIONS. 2007. Philom Bios sale positive: owner. En: <<http://www.canada.com/saskatoonstarphoenix/news/business/story.html?id=df86c419-bebb-46f2-8706-01787999c3ee>>. Revisado el 11 de octubre de 2013.
- CARRION, M.A., L. AZNAR, J.J. MARTÍNEZ, M.J. VICENTE, M.MUNUERA, E. CONESA & F. CONESA (2007). Luces y sombras en la conservación de *Astragalus nitidiflorus*. Conservación Vegetal, 11: 35-37.
- CASTELLARI C.C. & QUADRELLI. 2004. Persistencia en el suelo de cepas de *Sinorhizobium meliloti*. FCA-UNMdP. Ciencia del suelo 22. Argentina.
- CASTROVIEJO, S. (2002). Riqueza florística de la Península Ibérica e Islas Baleares. El proyecto "Flora ibérica". En "*La Diversidad Biológica de España*". F.D. Pineda, J.M. De Miguel, M.A. Casado, J. Montalvo (eds.), pp. 319-330. Pearson Educación, S.A., Madrid.
- CASTROVEJO S., TALAVERA S., AEDO C., ROMERO ZARCO C., SAEZ L., SALGUEIRO F.J., VELAYOS M (eds). 1986. *Flora-Península Ibérica. Tomo VII: Leguminosae*. Real Jardín Botánico - CSIC. Madrid, España.
- CATROUX G., HARTMANN A., REVELLIN C. 2001. *Trends in rhizobial inoculant production and use*. Plant and Soil. 230. p. 21-30.
- CHEN, H. & MAUN, M.A. (1998). Population ecology of *Cirsium pitcheri* on Lake Hurón sand dunes. III. Mechanisms of seed dormancy. *Canadian Journal of Botany*, 76(4): 575-586.
- COMISIÓN DE LAS COMUNIDADES EUROPEAS. 2001. *Directiva 2001/36/CE de la Comisión, de 16 de mayo de 2001 por la que se modifica la Directiva 91/414/CEE del Consejo relativa a la comercialización de productos fitosanitarios*. Diario Oficial de las Comunidades Europeas num. L 164 de 20/06/2001. p. 0001-0038.
- CONSEJO DE LAS COMUNIDADES EUROPEAS. 1991. *Directiva 91/414/CEE del Consejo, de 15 de julio de 1991, relativa a la comercialización de productos fitosanitarios*. Diario Oficial de las Comunidades Europeas nº L 230 de 19/08/1991. p. 0001-0032.
- COPETE, M.A. (2005). Aspectos de la biología poblacional y reproductiva de las especies vegetales amenazadas: *Helianthemum polygonoides*, *Coincya rupestris* subsp. *Rupestris*, *Sideritis serrata* y *Sisymbrium cavanillesianum*. Tesis Doctoral. Universidad de Castilla-La Mancha.
- COX R.M., FAY P., FOGG G.E. 1964. *Nitrogen fixation and photosynthesis in a subcellular fraction of the blue-green alga Anabaena cylindrica*. Biochimica et Biophysica Acta. 88. p. 208-210.

- CUADRADO B., RUBIO G., SANTOS W. 2009. Caracterización de cepas de *Rhizobium* y *Bradyrhizobium* (con habilidad de nodulación) seleccionados de los cultivos de frijol caupi (*Vigna unguiculata*) como potenciales bioinóculos. Rev. Colomb. Quím. Farm. Vol. 38 (1). p. 78-104.
- DALAL R.C., STRONG W.M., DOUGHTON J.A., WESTON E.J., MCNAMARA G.T., COOPER J.E. 1997. *Sustaining productivity of a Vertisol at Warra, Queensland, with fertilizers, no-tillage or legumes. 4. Nitrogen fixation, water use and yield of chickpea*. Australian Journal of Experimental Agriculture. 37. p. 667-676.
- DARDANELLI M.S., FERNÁNDEZ DE CÓRDOBA F.J., ESPUNY M.R., RODRÍGUEZ CARVAJAL M.A., SORIA DÍAZ M.E., GIL SERRANO A.M., OKON Y, MEGÍAS M. 2008. *Effect of Azospirillum brasilense coinoculated with Rhizobium on Phaseolus vulgaris flavonoids and Nod factor production under salt stress*. Soil Biology and Biochemistry. 40. p. 2713-2721.
- DATE R.A. 2001. *Advances in inoculant technology: A brief review*. Australian Journal of Experimental Agriculture. 41. p. 321-325.
- DAZA A., SANTAMARÍA C., RODRÍGUEZ-NAVARRO D.N., CAMACHO M., ORIVE R., TEMPRANO F. 2000. *Perlite as carrier for bacterial inoculants*. Soil Biology and Biochemistry. 32. p. 567-572.
- DE FELIPE M. R. 2006. *Fijación biológica de dinitrógeno atmosférico en vida libre*. En Bedmar E, Gonzalo J, Lluch C, Rodelas B (eds). *Fijación de Nitrógeno: Fundamentos y Aplicaciones*, p. 9-16. Sociedad Española de Microbiología (SEFIN). Granada, España.
- DEBUSSCHE, M. & TLIMNPSON. D. (2003). Habitat differentiation between two closely related Mediterranean plant species, the endemic *Cyclamen balearicum* and the widespread *C.repandum*. Acta Oecologica, 24: 35-45.
- DÉNARIÉ, J., F. DEBELLÉ, AND J.-C. PROMÉ. 1996. *Rhizobium* lipo-chitooligosaccharide nodulation factors: Signaling molecules mediating recognition and morphogenesis. Ann. Rev. Biochem. 65:503-535.
- DENTON M.D., PEARCE D.J., BALLARD R.A., HANNAH M.C., MUTCH L.A., NORNG S., SLATTERY J.F. 2009. *A multi-site field evaluation of granular inoculants for legume nodulation*. Soil Biology and Biochemistry. 41, 12. p. 2508-2516.
- DERPSCH R, FRIEDRICH T. 2009. *Global overview of Conservation Agriculture No-till adoption*. En: 4th World Congress on Conservation Agriculture New Delhi, India. (libro de actas del congreso).
- DEVESA, J.A. (1999). Protección de la flora en Extremadura. *Conservación Vegetal*, 4: 8.

- DEVESA, J.A. & ORTEGA, A. (2004). *Especies vegetales protegidas en España: plantas vasculares*. Ministerio de Medio ambiente. Madrid.
- DI CELLO F, BEVIVINO A, CHIARINI L, FANI R, PAFFETTI D, TABACCHIONI S, DALMASTRI C. 1997. *Biodiversity of a Burkholderia cepacia population isolated from the maize rhizosphere at different plant growth stages*. Applied and Environmental Microbiology. 63. p. 4485-4493.
- DIRECCIÓN GENERAL DEL MEDIO NATURAL, (2004). Memoria justificativa de la propuesta de catalogación de la especie de flora *Astragalus nitidiflorus* Jiménez Mun. & Pan como especie en peligro de extinción. Región de Murcia. Consejería de Agua, Agricultura y Medio Ambiente.
- DJORDJEVIC, S. P., H. CHEN, M. BATLEY, J. W. REDMON, B. G. ROLFE. 1987. Nitrogen fixation ability of exopolysaccharide synthesis mutants of *Rhizobium* sp. strain NGR234 and *Rhizobium trifolii* is restored by the addition of homologous exopolysaccharides. J. Bacteriol. 169:53-60.
- D.O.C.E. (1992). Directiva 92/43/CEE del Consejo de 21 de mayo de 1992 relativa a la conservación de los hábitats naturales y de la fauna y flora silvestres. D.O.C.E. n° L206: 7-50 Bruselas.
- DOBEREINER J. 1961. *Nitrogen-fixing bacteria of the genus Beijerinckia Derx in the rhizosphere of sugar cane*. Plant and Soil 15. p. 211-216.
- DOMÍNGUEZ, F., et al (eds.) (2000): Lista Roja de la Flora Vascular Española. Comisión de Flora del Comité Español de la Unión Mundial para la Conservación de la Naturaleza (UICN). Conservación Vegetal, 6: 39 pp.
- DONG, T.T., X. Q. Ma., C. CLARKE, Z. H. SONG, Z. H. SONG, Z. N. Ji., C. K. Lo. Y k. W. Tsim. 2003. Phylogeny of *Astragalus* in China: Molecular evidence from the DNA sequences of 5S rRNA spacer, ITS, and 18S rRNA. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 51: 6709-6714.
- DOWNIE, J. A. 1998. Functions of rhizobial nodulation genes, p. 387-402. En: H. P. Spaink,, A. Kondorosi, and P. J. J. Hooykaas (eds). *The Rhizobiaceae: Molecular Biology of Model Plant-Associated Bacteria*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- DRAPER, D.; ROSSELLO-GRAELL, A.; GARCÍA, C; TAULEIGNE GOMES, C. & SERGIO, C. (2003). Application of GIS in plant conservation programmes in Portugal. *Biological Conservation*, 113:337-349.
- ELOFF, J.N. & POWRIE, L.W. (1990). How many plañís are needed for ex situ conservation to ensure the subsequent establishment of viable populations? *In Proceedings of the International Symposium on Botanical Gardens*. H. Shen-an, V.H. Heywood & P.S. Ashton (eds.), pp. 91-104. Jiangsu Science & Technology Publishing House. Nanjing.

- ESCUDERO, A.; IRIONDO, J.M. & TORRE», M.E. (2003). Spatial analysis of genetic diversity as a tool for plant conservation. *Biological Conservation*, 113: 351-365.
- ESPAÑA. 2002. *Ley 43/2002, de 20 de noviembre, de sanidad vegetal*. Boletín Oficial del Estado núm. 279 de jueves 21 de noviembre de 2002. p. 40970-40988.
- ESPAÑA. 2005. *Real Decreto 824/2005, de 8 de julio, sobre productos fertilizantes*. Boletín Oficial del Estado núm. 171 de martes 19 de julio de 2005. p. 25592-25669.
- REFERENCIAS 177.
- ESPAÑA. 2006. *ORDEN APA/289/2006, de 27 de enero, por la que se ratifica el Reglamento de la indicación geográfica protegida «Alubia de La Bañeza-León»*. Boletín Oficial del Estado núm. 35 de viernes 16 de febrero de 2006. p. 5347-5354.
- ESPAÑA. 2008a. *Real Decreto 1769/2007 de 28 de diciembre, por el que se modifica el Real Decreto 824/2005, de 8 de julio, sobre productos fertilizantes*. Boletín Oficial del Estado núm. 14 de miércoles 16 enero 2008. p. 3140-3141.
- ESPAÑA. 2008b. *Orden APA/863/2008 de de 25 de marzo, por la que se modifican los anexos I, II, III, y VI del Real Decreto 824/2005, de 8 de julio, sobre productos fertilizantes*. Boletín Oficial del Estado núm. 79 de martes 1 de abril de 2008. p. 18141-18180.
- EUROPEAN CONSERVATION AGRICULTURE FOUNDATION, 2010. En: <<http://www.ecaf.org/>>. Revisado el 11 de octubre de 2013.
- FALK, D.A. (1988). The Center for Plant Conservation: conserving the native plant genetic diversity of the United States. *Diversity*, 16: 20-21.
- FALK, D.A. (1990). Integrated strategies for conserving plant genetic diversity. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 77: 38-47.
- FARRAND S.K., VAN BERKUM P.B., OGER P. 2003. *Agrobacterium is a definable genus of the family Rhizobiaceae*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 53. p.1681–1687.
- FERRAZ-GRANDE, F.G.A. & TAKAKI, M. (2001). Temperature dependent seed germination of *Dalbergia nigra* Allem (Leguminosae). *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 44(4): 401-404.
- FERRERIRA M.C., ANDRADE D.S., CHUEIRE L.M.O., TAKEMURA S.M., HUNGRIA M. 2000. *Tillage method and crop rotation effects on the population sizes and diversity of bradyrhizobia nodulating soybean*. *Soil Biology and Biochemistry*. 32. p. 627-637.

- FETTELL NA, O'CONNOR GE, CARPENTER DJ, EVANS J, BAMFORTH I, OTI-BOATENG C, HEBB DM, BROCKWELL J. 1997. *Nodulation studies on legumes exotic to Australia: the influence of soil populations and inocula of Rhizobium leguminosarum bv. viciae on nodulation and nitrogen fixation by field peas*. Applied Soil Ecology. 5, 3. p. 197-210.
- FISCHER, M. & MATTHIES, D. (1998). Experimental demography of the rare *Gentianella germanica*: seed bank formation and microsite effects on seedling establishment. *Ecography*, 21:269-278.
- FRANK B. (1889) *Ueber die Pilzsymbiose der Leguminosen*. Bet. Dtsch. Bot. Ges. 7:332-346.
- FRED E.B., BALDWIN I.L., MCCOY E. 1932. *Root Nodule Bacteria and Leguminous Plants*. University of Wisconsin Press, Madison. EE.UU.
- FREIBERG, F., R. FELLAY, A. BAIROCH, W. J. BROUGHTON, A. ROSENTHAL, AND X. PERRET. 1997. Molecular basis of symbiosis between *Rhizobium* and legumes. *Nature* (London) 387: 394- 401.
- FUENTES L., TAPIA A, JIMENEZ T., MASCARUA M., SANTOYO Y., CASO L., HILARIO T., ROMERO H., CAJICA M., LEÓN D; ROSALES P. Y CASTILLO M. 2003. Bacterias acéticas: diversidad e interacción con las plantas (En línea). Disponible en <http://www.elementos.buao.mx/num49/pdf/47.pdf>.
- GALICIA, D. & P. SÁNCHEZ (2003): *Astragalus nitidiflorus* Jiménez et Pau. En: Bañares, Á., G. Blanca, J. Güemes, J. C. Moreno & S. Ortiz (eds.). en *Atlas y Libro Rojo de la Flora Vascular Amenazada de España. Taxones prioritarios*. Dirección General de Conservación de la Naturaleza. Madrid. PAU, C. 1910. *Astragalus nitidiflorus* Jiménez et Pau. N. Sp. Bol. Soc. Aragonesa Ci. Nat. 9: 130-131.
- GARCÍA, E.G. & DI STEFANO, J.F. (2000). Temperature and seed germination in *Dalbergia retusa* (Papilionaceae), an endangered tree. *Revista de Biología Tropical*, 48(1): 43-45.
- GARCÍA, M.B. (2002). Interés de los estudios demográficos en la conservación. Catalogación de especies amenazadas. En *Biología de la conservación de plantas amenazadas*. A. Bañares (coordinador). Organismo Autónomo de Parques Nacionales. Madrid.
- GÓMEZ-CAMPO, C. (2002). Especies vegetales amenazadas. En "*La Diversidad Biológica de España*". F.D. Pineda, J.M. De Miguel, M.A. Casado, J. Montalvo (eds.), pp. 319-330. Pearson Educación, S.A., Madrid.
- GOMEZ-SOSA, E. 1979. Las esoecies sudameriacanas del género *Astragalus* (Leguminosae) las especies patagónicas argentinas. *Darwiniana* 22: 313-376.

- GOMEZ-SOSA, E. 1981. Novedades en el género *Astragalus* (Leguminosae-Galegeae). Darwiniana 23: 507-516.
- GOMEZ-SOSA, E. 1982. Novedades en el género *Astragalus* (Leguminosae-Galegeae). Darwiniana 24: 23-31.
- GOMEZ-SOSA, E. 1997. A new *Astragalus* (Leguminosae) from Argentina, notable for placentation of its sedes. Brittonia: 537-541.
- GONCHAROV, N.F., A. G. GORSHKOVA, M. G. POPOV & I. T. VASIL CHENKO. 1965. *Astragalus*, pp. 1-918 En: V. L. Komarov y B. K. Shishkin (eds.). Flora of the U.S.S.R. Vol. 12. Israel Program for Scientific Translations, Jerusalem, Smithsonian Institution and the National Science Foundations.
- GONZÁLEZ, J. E., AND B. L. REUHS. 1996. Low molecular weight EPS2 of *Rhizobium meliloti* allows nodule invasion in *Medicago sativa*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 93:8636-8641 .
- GRAHAM P.H., DRAEGER K.J., FERREY M.L., CONROY M.J., HAMMER B.E., MARTÍNEZ E., AARONS S.R., QUINTO C. 1994. *Acid pH tolerance in strains of Rhizobium and Bradyrhizobium, and initial studies on the basis for acid tolerance of Rhizobium tropici UMR1899*. Canadian Journal of Microbiology. 40. p. 198-207.
- GRAHAM P.H., Parker C.A. 1964. *Diagnostic features in the characterization of the root nodule bacteria of legumes*. Plant and Soil. 20. p. 383-386.
- GRAHAM PH, Parker CA. 1964. *Diagnostic features in the characterization of the root nodule bacteria of legumes*. Plant and Soil. 20. p. 383-386.
- GRAHAM P.H., RANILLI P. 1997. *Common bean* (*Phaseolus vulgaris* L.). Field Crops Research 53. p. 131-146.
- GRAHAM PH, VANCE CP. 2003. Legumes: importance and constraints to greater use. Plant Physiology. 131. p. 872-877.
- GRAHAM PH, VANCE PV. 2000. *Nitrogen fixation in perspective: an overview of research and extension needs*. Field Crops Research. 65, 2-3. p. 93-106.
- GRAHAM PH, VITTERI SE, MACKIE F, VARGAS AT, PALACIOS A. 1982. *Variations in acid soil tolerance among strains of Rhizobium phaseoli*. Field Crops Research. 5. p. 121-128.
- GRAHAM PH. 1963. *Antibiotic sensitivities of the root nodule bacteria of legumes*. Australian Journal of Biological Sciences. 16. p. 557-559.
- GRAHAM PH. 1981. *Some problems of nodulation and symbiotic nitrogen fixation in Phaseolus vulgaris L.: A review*. Field Crops Research. 4. p. 93-112.

- GRANGE L, HUNGRIA M, GRAHAM PH, MARTÍNEZ-ROMERO E. 2007. New insights into the origins and evolution of rhizobia that nodulate common bean (*Phaseolus vulgaris*) in Brazil. *Soil Biology & Biochemistry*. 39. p. 867–876.
- GRAY, A. 1864. A revisión and arrangement (mainly by the fruit) of the North American species of *Astragalus* and *Oxytropis*. *Proceedings of American Academy of Arts* 6: 188-236.
- HADRI, A. E., H. P. SPAINK, T. BISSELING AND N. J. BREWIN. 1998. Diversity of root nodulation and rhizobial infection processes, p 347-360. En: H, P. Spaink,, A. Kondorosi, and P. J. J. Hooykaas (eds). *The Rhizobiaceae: Molecular Biology of Model Plant-Associated Bacteria*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht. The Netherlands.
- HAMZE, S.I. & JOLLS, C.L. (2000). Germination ecology of a federally threatened endemic thistle, *Cirsium pitcheri*, of the Great Lakes. *American Midland and Naturalist*, 143(1): 141-153.
- HARTMANN A, AMARGER N. 1991. *Genotypic diversity of an indigenous Rhizobium meliloti field population assessed by plasmid profiles, DNA fingerprinting and insertion sequence typing*. *Canadian Journal of Microbiology*. 37. p. 600-608.
- HERRANZ, J.M.; FERRANDIS, P.; COPETE, M.A. & MARTÍNEZ-SÁNCHEZ, J.J. (2002). Influencia de la temperatura de incubación sobre la germinación de 23 endemismos vegetales ibéricos o iberoafricanos. *Investigación Agraria. Producción y Protección Vegetal*. 17 (2): 229-245.
- HERRANZ, J.M.; FERRANDIS, P. & COPETE, M.A. (2003A). Influence of temperature, maternal source, and seed position in fruit on seed germination and ability to form soil seed banks in threatened species of *Coincya* (Cruciferae). *Israel Journal of Plant Sciences*, 51: 133-141.
- HERRANZ, J.M.; FERRANDIS, P. & COPETE, M.A. (2003B). Influence of light and temperature on seed germination and ability of the endangered plant species *Sisymbrium cavanillesianum* to form persistent soil seed banks. *Ecoscience*, 10 (4): 433-442.
- HERRIDGE DF. 2005. *Inoculation technology for legumes*. En: Dilworth MJ, James EK; Sprent JI, Newton, WE (eds). *Nitrogen-fixing Leguminous Symbioses*. Springer, Dordrecht, Holanda.
- HEYNDRIKX M, VAUTERIN L, VANDAMME P, KERSTERS K, DE VOS P. 1996. *Applicability of amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA) patterns in bacterial phylogeny and taxonomy*. *Journal of Microbiology Methods*. 8. p. 232-248.
- HEYWOOD, V.H. & IRIONDO, J.M. (2003). Plant conservation: old problems, new perspectives. *Biological Conservation*, 113: 321-335.

- HOULE, G.; MOREL, L.; REYNOLDS, C.E. & SIEGEL, J. (2001). The effect of salinity on different developmental stages of an endemic annual plant. *Áster laurentianus* (Asteraceae). *American Journal of Botany*, 88(1): 62-67.
- HOWIESON J, BALLARD R. 2004. *Optimising the legume symbiosis in stressful and competitive environments within southern Australia—some contemporary thoughts*. *Soil Biology and Biochemistry*. 36, 8. p. 1261-1273.
- HOWIESON J, MALDEN J, YATES RJ, O'HARA GW. 2000. *Techniques for the selection and development of elite inoculant strains of Rhizobium leguminosarum in Southern Australia*. *Symbiosis*. 28. p. 33-48.
- HUGHES RM, HERRIDGE DF. 1989. *Effect of tillage on yield, nodulation and nitrogen fixation of soybean in far north-coastal New SouthWales*. *Australian Journal of Experimental Agriculture*. 29. p. 671-677.
- HULTON CSJ, HIGGINS CP, SHARP PM. 1991. *ERIC sequences: a novel family of repetitive elements in the genomes of Escherichia coli, Salmonella typhimurium and other enterobacteria*. *Molecular Microbiology*. 5. p. 825-834.
- HUNGRIA M, ANDRADE DS, CHUEIRE LM DE O, PROBANZA A, GUTTIERREZ-MAÑERO FJ, MEGÍAS M. 2000. *Isolation and characterization of new efficient and competitive bean (Phaseolus vulgaris L.) rhizobia from Brazil*. *Soil Biology and Biochemistry*. 32. p. 1515-1528.
- HUNGRIA M, CAMPO RJ, MENDES IC. 2003. *Benefits of inoculation of the common bean (Phaseolus vulgaris) crop with efficient and competitive Rhizobium tropici strains*. *Biology and Fertility of Soils*. 39. p.88-93.
- HUNGRIA M, LOUREIRO MF, MENDES IC, CAMPO RJ, GRAHAM PH. 2005. *Inoculant preparation, production and application*. En: Werner D, Newton WE (eds). *Nitrogen Fixation in Agriculture, Forestry, Ecology*, Springer, Dordrecht, Holanda.
- HUNGRIA M, VARGAS MAT, ARAUJO RS. 1997. *Fixacao biologica do nitrogenio em feijoeiro*. In: Vargas MAT, Hungria M (eds) *Biologia dos Solos dos Cerrados*. EMBRAPA-CPAC, Planaltina, Brasil, p. 189–294.
- HUNGRIA M, VARGAS MAT. 2000. *Environmental factors affecting N₂ fixation in grain legumes in the tropics, with an emphasis on 180 Brazil*. *Field Crops Research*. 65. p. 151-164.
- IKEDA, H. & ITOH, K. (2001). Germination and water dispersal of seeds from a threatened plant species *Penthorvm chinense*. *Ecological Research*, 16(1): 99-106.

- IRIONDO, J.M.; ALBERT, M.J. & ESCUDERO, A. (2003). Structural equation modelling: an alternative for assessing causal relationships in threatened plant populations. *Biological Conservation*, 113:367-377.
- JOHNSTON, C.A. (1998). *Geographic Information Systems in Ecology*. Blackwell Science, Oxford.
- JONES, M. 1923. Revision of North American *Astragalus*. Published by the author, Salt Lake City, Utah.
- KAYE, T.N. & KUYKENDALL, K. (2001). Effects of scarification and cold stratification on seed germination of *Lupinus sulphureus* ssp. *kincaidii*. *Seed Science and Technology*, 29(3); 663-668.
- KEPHART, S. & PALADINO, C. (1997). Demographic change and microhabitat variability in a grassland endemic, *Suene douglasii* var. *oraria* (Caryophyllaceae). *American Journal of Botany*, 84(2): 179-189.
- KESSEL C, HARTLEY C. 2000. *Agricultural management of grain legumes: has it led to an increase in nitrogen fixation?*. Field Crops Research. 65, 2-3. p. 165-181.
- LAVIN, M., J. DOYLE Y J. PALMER.1990. Evolutionary significance of the loss of the chloroplast-DNA inverted repeat in the Leguminosae subfamily Papilionoidea. *Evolution* 44: 390-402.
- LEDINGHAM, G., 1957. Chromosome numbers of some Saskatchewan Leguminosae with particular reference to *Astragalus* and *Oxytropis*. *Canadian Journal of Botany* 35: 557-666.
- LEDINGHAM, G., 1960. Chromosome numbers in *Astragalus*. *Proceedings of the Genetic Society of Canada* 3: 15-18.
- LEDINGHAM, G., y B. REVER. 1963. Chromosome numbers of some southwest Asian species of *Astragalus* and *Oxytropis* (Leguminosae). *Canadian Journal of Genetics and Cytology* 5: 18-32.
- LEDINGHAM, G, 1957. Chromosome numbers of some Saskatchewan Leguminosae with particular reference to *Astragalus* and *Oxytropis*. *Canadian Journal of Botany* 35: 557-666.
- LEDINGHAM, G, & M. Fahselt. Chromosome numbers of some North American species *Astragalus* (Leguminosae). *Side* 1: 313-327.
- LEDINGHAM, G, & B. PEPPER. 1973. Chromosome numbers of some South American species of *Astragalus*. *Kurtziana* 7: 27-37.

- LENTZ, K.A. & JOHNSON, H.A. (1998). Factor affecting germination of endangered northeastern bulrush, *Scirpus ancistrochaetus* Schuyler (Cyperaceae). *Seed Science and Technology*, 26: 733-741.
- LEROUGE, P., P. ROCHE, C. FAUCHER, F. MAILLET, G. TRUCHET, J. C. PROMÉ, AND J. DÉNARIÉ. 1990. Symbiotic host-specificity of *Rhizobium meliloti* is determined by a sulphated an acylated glucosamine oligosaccharide signal. *Nature (London)* 344:781-784.
- LEWIS, G.P. 2005. Tribu Caesalpiniae. In Lewis, B. Schire, B. Mackinden & M. Lock (eds.) *Legumes of the world*. Royal Botanic Gardens, Kew.
- LIE T.A., MUILENBURG M, HIEP NH, AYHAN K. 1992. *Cultivation of Bradyrhizobium CB756 on sucrose prefermented by yeast*. *Canadian Journal of Microbiology*. 38. p. 569-572.
- LISTON, A. & J. WHEELER. 1994. The phylogenetic position of the genus *Astragalus* (Fabaceae): Evidence from the chloroplast genes *rpoC1* and *rpoC2*. *Biochemical Systematics and Ecology* 22: 377-388.
- LOCK, J.M. & K. SIMPSON. 1991. *Legumes of West Asia: A Check-list*. Royal Botanic Gardens, Kew.
- LÓPEZ-BELLIDO R.J., LÓPEZ-BELLIDO L., CASTILLO J.E., LÓPEZ-BELLIDO F.J. 2004. *Chickpea response to tillage and soil residual nitrogen in a continuous rotation with wheat: II. Soil nitrate, N uptake and influence on wheat yield*. *Field Crops Research*. 88, 2-3. p. 201-210.
- LÓPEZ-LARA, I. M., K. M. G. M. DRIFT, A. A. N. VAN BRUSSEL, J. HAVERKAMP., B.J.J. LUGTENBERG, J. E. THOMAS-OATES, AND H. P. SPAINK. 1995. Induction of nodule primordial on *Phaseolus* and *Acacia* by lipo-chitin oligosaccharide nodulation signals from broad-hostrange *Rhizobium* strain GRH2. *Plant Mol. Biol.* 29:465-477.
- LORDA, M. 2001. *Flora del Pirineo navarro*. Guineana: 7, 1-557.
- LOWRY O.H., ROSENBROUGH N.J., FARR A.H., RANDAL R.J. 1951. *Protein measurement with Folin phenol reagent*. *Journal of Biology and Chemistry*. 193. p. 265-275.
- LOWTHER W.L., PATRICK H.N. 1995. *Rhizobium strain requirements for improved nodulation of Lotus corniculatus*. *Soil Biology and Biochemistry*. 27. p.721-724.
- LUPWAYI N.Z., OLSEN P.E., SANDE E.S., KEYSER H.H., COLLINS M.M., SINGLETON P.W., RICE W.A. 2000. *Inoculant quality and its evaluation*. *Field Crops Research*. 65. p. 259-270.

- MACDONALD R.M. 1989. *An overview of crop inoculation*. En: Campbell R, Macdonald RM (eds) Microbial inoculation of crop plants. p.1-9, Special publication of the society of general microbiology, vol. 25. IRL Press, Oxford, Nueva York, EE.UU.
- MADIGAN MT, MARTINKO JM, PARKER J. 2003. Brock. *Biología de los Microorganismos*. Décima edición. Pearson-Alhambra. Madrid, España.
- MANJKHOLA, S.; DHAR, U. & RAWAI, R.S. (2003). Treatments to improve seed germination of *Arnebia benthamii*: an endangered medicinal herb of high altitude Himalaya. *Seed Science and Technology*, 31(3): 571-577.
- MARIN, J.M.; MONTES DIEZ, R. & RÍOS INSUA, D. (2003). Bayesian methods in plant conservation biology. *Biological Conservation*, 113: 379-387.
- MARRERO-GÓMEZ, M.V.; AREVALO, J.R.; BAÑARES, A. & CARQUÉ ÁLAMO, E. (2000). Study of the establishment of the endangered *Echium acanthocarpum* (Boraginaceae) in the Canary Islands. *Biological Conservation*, 94: 183-190.
- MARTÍNEZ, M.L. (2001). Facilitation of seedling establishment by an endemic shrub in tropical coastal sand dunes. *Plant Ecology*, 168: 333-345.
- MCINNES A, HOLFORD P, THIES JE. 2005. *Characterisation of dry and mucoid colonies isolated from Australian rhizobial inoculants strains for Medicago species*. Australian Journal of Experimental Agriculture. 45. p. 151-159.
- MENGES, E.S. & DOLAN, R.W. (1998). Demographic viability of populations of *Suene regia* in midwestern prairies: relationships with fire management, genetic variation, geographic location, population size and isolation. *Journal of Ecology*, 86 (1): 63-78.
- MENGES, E.S.; MCINTYRE, P.J.; FINER, M.S.; GOSS, E. & YAHR, R. (1999). Microhabitat of the narrow Florida scrub endemic *Dicerandra christmanii*, with comparisons to its congener *D.frutescens*. *Journal of the Torrey Botanical Society*. 126(1): 24-31.
- MERCK. 2006a. *Nitragin acquires Agribiotics Inc. to expand plant health technology portfolio*. En:
<http://www.nitragin.com/company/news.cfm?ARTICLE_TYPE_ID=1>. Revisado el 11 de octubre de 2013.
- MERCK. 2006b. *Nitragin Becomes EMD Crop BioScience*. En:
<http://www.nitragin.com/company/news.cfm?ARTICLE_TYPE_ID=1>. Revisado el 11 de octubre de 2013.
- MINISTERIO DE MEDIO AMBIENTE, (1999). *Estrategia española para la conservación y el uso sostenible de la diversidad biológica*. Ministerio de Medio Ambiente, Madrid.

- MINISTERIO DE MEDIO AMBIENTE, RURAL Y MARINO. 2007a. *Registro de Organismos de Control Biológico*. En: <<http://www.mapa.es/agricultura/pags/fitos/registro/fichas/pdf/RegistroOCB.pdf>>. Revisado el 11 de octubre de 2013.
- MINISTERIO DE MEDIO AMBIENTE, RURAL Y MARINO. 2007b. *Registro de Otros Medios de Defensa Fitosanitaria*. En: <<http://www.mapa.es/agricultura/pags/fitos/registro/fichas/pdf/RegistroODMF.pdf>>. Revisado el 11 de octubre de 2013.
- MOLANO-FLORES, B.; FEIST, M.A. & WHELAN, C.J. (2003). Seed germination, seedling survivorship, and host preference of *Agalinis auriculata* (Michx.) Blake (Orobanchaceae), an Illinois, USA, threatened species. *Natural Areas Journal*, 23(2): 152-157.
- MONZA J. & PALACIOS J. 2004. Fijación biológica de nitrógeno en la simbiosis rizobio-leguminosa. En: El metabolismo del nitrógeno en las plantas. Monza, J., y Márquez, A. (Eds). Almuzara estudios, S.A.
- MORAVCOVA, L. & FRANTIK, T. (2002). Germination ecology of *Puccinellia distans* and *Puccinellia limosa*. *Biología*, 57 (4): 441-448.
- MORENO, J.C. (2002). Bases para la caracterización de la flora vascular española amenazada. *Ecosistemas*, 3.
- MORGAN, J.W. (1998). Comparative germination responses of 28 temperate grassland species. *Australian Journal of Botany*, 46(2): 209-219.
- MUYZER G. 1999. *DGGE/TGGE a method for identifying genes from natural ecosystems*. Current Opinion in Microbiology. 20 p.323-327.
- NAVARRO, L. & GUITIAN, J. (2003). Seed germination and seedling survival of two threatened endemic species of the northwest Iberian peninsula. *Biological Conservation*, 109(3): 313-320.
- NIEHAUS, K., D. KAPP, AND A. PÜHLER. 1993. Plant defence and delayed infection of alfalfa pseudonodules induced by an exopolysaccharide (EPS I)-deficient *Rhizobium meliloti* mutant. *Planta* 190: 415-425.
- NOBBE F., HILTNER L. 1896. US Patent 570 813. Inoculation of the soil for cultivating leguminous plants.
- OKON Y., LABANDERA-GONZALEZ C.A. 1994. *Agronomic applications of Azospirillum - an evaluation of 20 years worldwide field inoculation*. Soil Biology and Biochemistry. 26. p. 1591-1601.

- OOSTERMEIJER, J.G.B.; LUIJTEN, S.H.; KRENOVA, Z.V.; DEN NIJS, H.C.M. (1998). Relationships between population and habitat characteristics and reproduction of the rare *Gentiana pneumonanthe* L. *Conservation biology*, 12(5): 1042-1053.
- OOSTERMEIJER, J.G.B.; LUIJTEN, S.H.; ELLIS-ADAM, A.C. & DEN NIJS, J.C.M. (2002). Future prospects for the rare, late-flowering *Gentianella germanica* and *Gentianopsis ciliata* in Dutch nutrient-poor calcareous grasslands. , 104(3): 339-350.
- OSBORN A.M., MOORE ERB., TIMMIS K.N. 2000. *An evaluation of terminal-restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) analysis for the study of microbial community structure and dynamics*. Environmental Microbiology. 2. p. 39-50.
- PARLAMENTO EUROPEO Y CONSEJO. 2009. *Directiva 2009/128/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 21 de octubre de 2009, por la que se establece el marco de la actuación comunitaria para conseguir un uso sostenible de los plaguicidas*. Diario Oficial de las Comunidades Europeas nº L 309 de 24/11/2009. p. 71-87.
- PARNISKE, M., P. E. SCHMIDT, K. KOSCH, AND P. MÜLLER. 1994. Plant defense responses of host plants with determinate nodules induced by EPS-defective *exoB* mutants of *Bradyrhizobium japonicum*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 7:631-638.
- PEARCE, D. & MORAN, D. (1998). The economics of biological diversity conservation. In "*Conservation biology for the coming decade*". P. L. Fiedler, P.M. Kareiva, (eds.), pp. 384-409. Chapman & Hall. New York.
- PEIX A., VELÁZQUEZ E., MARTÍNEZ-MOLINA E. 2007. *Molecular methods for biodiversity analysis of phosphate solubilizing microorganisms (PSM)*. En: Velázquez E, Rodríguez-Barrueco C (eds). First International Meeting on Microbial Phosphate Solubilization. Springer. Dordrecht, Holanda.
- PELLOCK, B. J., H.-P. CHENG, AND G. C. WALKER. 2000. Alfalfa root nodule invasion efficiency is dependent on *Sinorhizobium meliloti* polysaccharides. *J. Bacteriol.* 182:4310-4318.
- PÉREZ G., GÓMEZ G., NÁPOLES M.C., MORALES B. 2008. Aislamiento y caracterización de cepas de rizobios aisladas de diferentes leguminosas en la región de Cascajal, Villa Clara. Instituto de Investigación de Pastos y Forrajes e Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas. Vol. 31. Num.2. Cuba.
- PETERSEN D.J., SRINIVASAN M., CHANWAY C.P. 1996. *Bacillus polymyxa stimulates increased Rhizobium etli populations and nodulation when co-resident in the rhizosphere of Phaseolus vulgaris* . FEMS Microbiology Letters. 142, 2-3. p. 271-276.
- PODLECH, D. 1982. Neue aspekte zur evolution und gliederung der gattung Astragalus. *Mitteilungen der Botanischen Staatssammlung München* 18: 359-378.
- PODLECH, D. 1983. Zur taxonomie und nomenclatur der tragacanthoiden Astragali. *Mitteilungen der Botanischen Staatssammlung München* 19: 1-23.

- PODLECH, D. 1984. Revision von Astragalus L. sect. Herpocaulos Bunge. Mitteilungen der Botanischen Staatssammlung München 20: 441-449.
- PODLECH, D. 1986. Taxonomic and phytogeographical problems in Astragalus of the Old World and South-West Asia. Proceedings of the Royal Society of Edinburgh 89: 37-43.
- PODLECH, D. 1999. *Astragalus* in Castroviejo, S. (coord.), Flora Ibérica. Vol. VII (i): 279-338. Real Jardín Botánico, C. S. I. C. Madrid.
- PODLECH, D. 1999. *Astragalus* in TALAVERA, S. et al. (Eds.): Flora iberica VII(I). Leguminosae (partim). CSIC. Real Jardín Botánico. Madrid. Madrid. SÁNCHEZ, P. M. Á. CARRIÓN, A. HERNÁNDEZ & J. GUERRA. (2002): Libro Rojo de la flora silvestre protegida de la Región de Murcia. Tomo II. Consejería de Agricultura, Agua y Medio Ambiente. Dirección General del Medio Natural. Murcia.
- POUPOT, R., E. MARTÍNEZ-ROMERO., AND J.-C. PROMÉ. 1993. Nodulation factors from *Rhizobium tropici* are sulfated or nonsulfated chitopentasaccharides containing an *N*-methyl- *N*-acylglucosaminyl terminus. Biochemistry 32:0430-10435.
- PRELL J, POOLE P. 2006. *Metabolic changes of rhizobia in legume nodules*. Trends in Microbiology. 14, 4. p. 161-168.
- PRICE, N. P. J., B. RELIC, F. TALMONT, A. LEWIN, D. PROMÉ, S. G. PUEPPKE, F. MAILLET, J. DÉNARIÉ, J.-C. PROMÉ, W. J. BROUGHTON. 1992. Broad-host-range *Rhizobium* species strain NGR234 secretes a family of carbamoylated, and fucosylated, nodulation signals that are *O*- acetylated or sulphated. Mol. Microbiol. 6:3575-3584.
- PUEPPKE, S. G., AND W. J. BROUGHTON. 1999. *Rhizobium* sp. strain NGR234 and *R. fredii* USDA257 share exceptionally broad, nested host ranges. Mol. Plant-Microbe Interac. 12:293- 318.
- PUTNOKY, P. G. PETROVICS, A. KERESZT, E. GROSSKOPF, D. T. CAM HA, Z. BANFALVI, A. KONDOROSI. 1990. *Rhizobium meliloti* lipopolysaccharide and exopolysaccharide can have the same function in the plant-bacterium interaction. J. Bacteriol. 172:5450-5458.
- QUINTANA-ASCENCIO, P.F.; DOLAN, R.W. & MENGES, E.S. (1998). *Hypericum cumulicola* demography in unoccupied and occupied Florida scrub patches with different time-since-fire. *Journal of Ecology*, 86(4): 640-651.
- QUINTANA-ASCENCIO, P.F.; MENGES, E.S. & WEEKLEY, C.W. (2003). A fire-explicit population viability analysis of *Hypericum cumulicola* in Florida rosemary scrub. *Conservation Biology*, 17(2): 433-449.
- REAL JARDÍN BOTÁNICO, (1999). Revista *Anales del Jardín Botánico de Madrid*, 57(1).

- RIVAS-MARTÍNEZ, S.; DÍAZ, T.E.; FERNÁNDEZ-GONZÁLEZ, F.; IZCO, J.; LOIDI, J.; LOUSA, M. & PENAS, A. (2002). Vascular plant communities of Spain and Portugal. *Itinera Geobotanica* 15: 5-922.
- RIVAS R., GARCÍA-FRAILE P., VELÁZQUEZ E. 2009. *Taxonomy of Bacteria Nodulating Legumes*. Microbiology Insights. 2. p. 51-69.
- RIVAS R., VELÁZQUEZ E., VALVERDE A., MATEOS P.F., MARTÍNEZ-MOLINA E. 2001. A two primers random amplified polymorphic DNA procedure to obtain polymerase chain reaction fingerprints of bacterial species. *Electrophoresis*. 22. p. 1086-1089.
- ROCHE, P, F. DEBELLÉ, F. MAILLET, P. LEROUGE, C. FAUCHER, G. TRUCHET, DÉNARIÉ J., AND J.- C. PROMÉ. 1991. Molecular basis of symbiotic host specificity in *Rhizobium meliloti*: *nodH* and *nodPQ* genes encode the sulfation of lipo-oligosaccharide signals, *Cell* 67: 1131-1143.
- RODÍÑO A.P., SANTALLA M., DE RON A.M., DREVON J.J. 2005. *Variability in nitrogen symbiotic fixation of white landraces of common bean from the Iberian Peninsula*. *Symbiosis*. 40. p.69-78.
- RODRÍGUEZ-NAVARRO D.N., BUENDÍA A.M., CAMACHO M., LUCAS M.M., SANTAMARÍA C. 2000. *Characterization of Rhizobium spp. Bean isolates from South-West Spain*. *Soil Biology and Biochemistry*, 32, 11-12. p. 1601-1613.
- RODRÍGUEZ-NAVARRO D.N., SANTAMARÍA C., TEMPRANO F., LEIDI E.O. 1999. *Interaction effects between Rhizobium strain and bean cultivar on nodulation, plant growth, biomass partitioning and xylem sap composition*. *European Journal of Agronomy*. 11. p.131-143.
- RODRÍGUEZ-NAVARRO D.N., VIDEIRA E CASTRO I., ALBAREDA M., TEMPRANO F. 2009. *Presente y futuro de los biofertilizantes en Iberoamérica: Península Ibérica*. Red CYTED: Fertilizantes biológicos para la agricultura y el medio ambiente - BIOFAG. La Habana, Cuba. (Libro de actas de la reunión).
- ROUGHLEY R.J., PULSFORD D.J. 1982. *Production and control of legume inoculants*. En: Vincent JM (ed). *Nitrogen Fixation in Legumes*.p. 1933-2009. Academic Press. Sydney, Australia.
- ROUGHLEY RJ, VINCENT JM. 1967. *Growth and survival of Rhizobium spp. in peat culture*. *Journal of Applied Bacteriology*. 30. p. 362–376.
- RUBENCHIK LI. 1963. *Azotobacter and its use in agriculture*. Academy of sciences of the Ukrainian SSR, Microbiological Institute D.K. Zabolotnyi. Israel programme for scientific translations. Jerusalén, Israel. (de un texto ruso publicado en 1960).

- RUFFO ML, BULLOCK DG, BOLLERO GA. 2004. *Soybean yield as affected by biomass and N uptake of cereal rye in winter cover crop rotations*. Agronomy Journal. 96. p. 800-805.
- RYDBERG, P. 1929. Astragalaceae. North American Flora 24: 251-462.
- RZEDOWSKI, G.C. & J. RZEDOWSKI. 2001. Flora fanerogámica del Valle de México. 2ª. Ed., Instituto de Ecología, A.C. y Comisión Nacional para el uso y Conocimiento de la Biodiversidad Pátzcuaro, Michoacán. México. 1406 pp. Saiki R., S. Scharf, F. Faloon, K. Mullis, G. Horn, H. Erlich y N. Arnheim. 1985.
- SAINZ OLLERO, H.; MORENO, J.C.; DOMÍNGUEZ, F.; GALICIA, D. & MORENO, L. (1994). Conservación de la flora española amenazada. *Ecosistemas*, 9-10: 58-65.
- SAINZ OLLERO, H. & MORENO, J.C. (2002). Flora vascular endémica española. En "*La Diversidad Biológica de España*". F.D. Pineda, J.M. De Miguel, M.A. Casado, J. Montalvo (eds.), pp. 175-195. Pearson Educación, S.A, Madrid.
- SÁNCHEZ GÓMEZ, P.; CAMÓN, MA.; HERNÁNDEZ, A. & GUERRA, J. (2002). *Libro Rojo de la Flora Silvestre Protegida de la Región de Murcia*. Consejería de Agricultura, Agua y Medio Ambiente. Dirección General del Medio Natural, Murcia.
- SÁNCHEZ GÓMEZ, P; HERNÁNDEZ, J.A.; LÓPEZ, J.B.; VERA PÉREZ & CAMÓN, M.A. (2004). *Atlas y Libro Rojo de la Flora Vascular Amenazada de España*.
- SÁNCHEZ, P. M. Á. HERNÁNDEZ, J.A. LÓPEZ, J.B.VERA & M.A. CARRIÓN (2005). *Astragalus nitidiflorus*. En Atlas y Libro Rojo de la Flora Vascular Amenazada de España. Taxones prioritarios. Dirección General para la Biodiversidad, Publicaciones O.A.P.N., Madrid 1.069 pp.
- SÁNCHEZ de L-C, J.M. 2008. Las leguminosas Plantas ideales para xerojardinería. Comunicación XXXV. Congreso Parjap. Elche.
- SANDERSON, M. 1989. Patterns of homoplasy in North American *Astragalus*. Ph. D. dissertation, University of Arizona, Tucson.
- SANDERSON, M. & J. DOYLE. 1993. Phylogenetic relationships in North American *Astragalus* (Fabaceae) based on chloroplast DNA restriction site variation. *Systematic Botany* 18: 395-408.
- SANZ HERRAÍZ, C. (1992). Naturalismo español y biogeografía. En "*Naturalismo y geografía en España*". J. Gómez, N. Ortega (eds.). pp. 135-197. Fundación Banco Exterior, Madrid.

- SATTERTHWAITE, W.H.; MENGES, E.S. & QUINTANA-ASCENCIO, P.F. (2002). Assessing scrub buckwheat population viability in the relation to fire using multiple modeling techniques. *Ecological Applications*, 12(6): 1672-1687.
- SMITH, M. & CAWLY, J. (2002). Effect of achene morphology and mass on germination and seedling growth of *Boltonia decurrens* (Asteraceae), a threatened floodplain species. *Rhodora*, 104(917): 1-13.
- SMITH, RS. 1992. *Legume inoculant formulation and application*. Canadian Journal of Microbiology. 38. p. 485-492.
- SOMASEGARAN P. 1985. *Inoculant production with diluted liquid cultures of Rhizobium spp. and autoclaved peat: evaluation of diluents, Rhizobium spp., peats, sterility requirements, storage, and plant effectiveness*. Applied and Environmental Microbiology. 11. p. 398-405.
- SOUZA, V.C. Y H. LORENZI. 2005. Botânica Sistemática. Guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II. Editora Plantarum. Nova Odessa, San Pablo, Brasil. 640 p.
- SPAINK, H. P. 2000. Root nodulation and infection factors produced by rhizobial bacteria. *Ann. Rev. Microbiol.* 54:257-288.
- SPAINK, H. P., A. KONDOROSI, AND P. J. J. HOOYKAAS. 1998. *The Rhizobiaceae: Molecular Biology of Model Plant-Associated Bacteria*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- SPELLENBERG, R. 1974. Chromosome number as an indication of relationships of *Astragalus*, section *Strigulosi* (Leguminosae), with descriptive notes on *A. altus*. *The Southwestern Naturalist* 18: 393-396.
- SPRENT, J.I. 2001. *Nodulation in legumes*. Royal Botanic Gardens, Kew, UK.
- SPRENT, J.I. 2009. *Legume nodulation. A global perspective*. Wiley-Blackwell. Chichester, England.
- STACEY G. 2007. *The Rhizobium-Legume Nitrogen-Fixing Symbiosis*. En: Bothe H, Ferguson SJ, Newton WE (eds). *Biology of the Nitrogen Cycle*. Springer. Elsevier. Amsterdam, Holanda.
- STANNERS, D. & BOURDEAU, P., EDS. (1995). *Europe's Environment. The Drobis Assesment*. Earthscan Publications. European Environment Agency. Copenhagen, Denmark.
- STEPHENS JHG, RASK HM. 2000. *Inoculant production and formulation*. *Field Crops Research*. 65. p. 249-258.

- STEVENS, P.F. 2009. Angiosperm Phylogeny Website. <<http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/>>.
- STURZ AV, CHRISTIE BR. 2003. *Beneficial microbial allelopathies in the root zone: the management of soil quality and plant disease with rhizobacteria*. Soil & Tillage Research. 72. p.107-123.
- SULLIVAN, J. T., AND C. W. RONSON, 1998. Evolution of rhizobia by acquisition of a 500-kb symbiosis island that integrates into a phe-tRNA gene. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 95;5145- 5149.
- TAIZ L, ZEIGER E. 2006. *Plant Physiology*. The Benjamin/Cummings Publishing Company. Redwood City, EE.UU.
- TALAVERA, S. (1999): Sobre el tratamiento de la Tribu Astragaleae Bercht. & J. Presl (Papilioideae, Leguminosae) en "Flora ibérica" Anales Jard. Bot. Madrid 57 (1): 218-220.
- THIES JE, SINGLETON PW, BOHLOOL BB. 1991. *Influence of the size of indigenous rhizobial populations on establishment and symbiotic performance of introduced previous rhizobia on field-grown legumes*. Applied and Environmental Microbiology. 57. p. 19–28.
- TODD, B.L.; COONS, J.M. & OWEN, H.R. (2002). Scarification technique affects germination of *Stylisma pickeringii* (Patterson bindweed), an Illinois endangered plant. *American Midland and Naturalist*, 148(1): 190-192.
- TSAI CM, FRASCH CE. 1982. *A sensitive silver stain for detecting lipopolysaccharides in polyacrilamide gels*. Analytical Biochemistry. 119. p. 115-119.
- UICN (2007). 2007 IUCN Red List of Threatened Species. VÁZQUEZ, F.M., E. DOMÍNGUEZ & J.A. DEVESA (1991): Nueva localidad de *Astragalus nitidiflorus* Jiménez y Pau en España. Acta Bot. Malacitana. Vol. XVI: 486
- URBANO B, GONZÁLEZ-ANDRÉS F, BALLESTEROS A. 2006. *Allelopathic potential of cover crops to control weeds in Barley*. Allelopathy Journal. 17. p. 53-64.
- VAN AUKEN, O.W. (2001). Germination requirements of seeds of *Helianthus paradoxus* (Asteraceae). *Texas Journal of Science*, 53 (2): 157-170.
- VÁZQUEZ, F.M., E. DOMÍNGUEZ & J.A. DEVESA (1991): Nueva localidad de *Astragalus nitidiflorus* Jiménez y Pau en España. Acta Bot. Malacitana. Vol. XVI: 486
- VÁZQUEZ, F.M., RAMOS, S.; FERNÁNDEZ, A. & J.M. LÓPEZ. (2004): Especies protegidas de Extremadura: Flora. Consejería de Agricultura y Medio Ambiente. Junta de Extremadura. 414pp.

- VELÁZQUEZ E, MARTÍNEZ-ROMERO E, RODRÍGUEZ-NAVARRO DN, TRUJILLO ME, DAZA A, MATEOS PF, MARTÍNEZ-MOLINA E, VAN BERKUM P. 2001a. *Characterization of rhizobial isolates of Phaseolus vulgaris by staircase electrophoresis of low-molecular-weight RNA*. Applied and Environmental Microbiology. 67. p. 1008-1010.
- VERSALOVIC H, SCHNEIDER M, DE BRUIJN FH, LUPSKI JR. 1994. *Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction*. Methods of Molecular and Cellular Biology. 5. p.25-40.
- VILKOMERSON, H. 1943. Chromosomes of *Astragalus*. Torrey Botanical Club Bulletin 46: 49-57.
- VV.AA. (2000). Lista Roja de la Flora Vascular Española (valoración según categorías UICN). *Conservación Vegetal*, 6(extra): 11-38.
- WALCK, J.L.; BASKIN J.M. & BASLIIN C.C. (1999A). Roles of succession, light, nutrients and disturbance on population vigor and maintenance of the rare plant *Solidago shortii* (Asteraceae). *Plant Ecology*, 145(1): 133-147.
- WALCK, J.L.; BASKIN J.M. & BASKIN C.C. (1999B). Relative competitive abilities and growth characteristics of a narrowly endemic and a geographically widespread *Solidago species* (Asteraceae). *American Journal of Botany*, 86 (6): 820-828.
- WALCK, J.L.; BASKIN, J.M. & BASKIN, C.C. (1999C). Ecology of the endangered species *Solidago shortii*. VI. Effects of habitat type, leaf litter, and soil type on seed germination.
- WESTON LA. 1990. *Cover crop and herbicide influence on row crop seedling establishment in no-tillage culture*. Weed Science. 38. p.166-171.
- WESTON LA. 1996. *Utilization of allelopathy for weed management in agroecosystems*. Agronomy Journal. 88. p. 860-866.
- WHEATLEY DM, MACLEOD DA, JESSOP RS. 1995. *Influence of tillage treatments on N₂ fixation of soybean*. Soil Biology and Biochemistry. 27. p. 571-574.
- WILLIAMS, M. C. & L. F. JAMES. 1975. Toxicity of nitro-containing *Astragalus* to sheep and chicks. Journal Range Management 28: 260-263.
- WOJCIECHOWSKI, M., M. SANDERSON & M. HU. 1999. Evidence on the monophyly of *Astragalus* (Fabaceae) and its major subgroups based on nuclear ribosomal DNA ITS and chloroplast DNA trnL intron data. Systematic Botany 24: 409-437.
- XAVIER JC, GERMIDA JJ. 2002. *Response of lentil under controlled conditions to co-inoculation with arbuscular mycorrhizal fungi and rhizobia varying in efficacy*. Soil Biology and Biochemistry. 34, 2. p. 181-188.

- YANG, G. P., F. DEBELLÉ, A. SAVAGNAC, M. FERRO, O. SCHILTZ, F. MAILLET, D. PROMÉ, M. TREILHOU, C. VIALAS, K. LINDSTROM, J. DÉNARIÉ, J.-C. PROMÉ. 1999. Structure of the *Mesorhizobium huakuii* and *Rhizobium galegae* Nod factors: a cluster of phylogenetically related legumes are nodulated by rhizobia producing Nod factors with α , β -unsaturated *N*-acyl substitutions. *Mol. Microbiol.* 34:227-237.
- YOUNG JM, KUYKENDALL LD, MARTINEZ-ROMERO E, KERR A, SAWADA H. 2001. A revision of *Rhizobium Frank 1889*, with an emended description of the genus, and the inclusion of all species of *Agrobacterium Conn 1942* and *Allorhizobium undicola de Lajudie et al. 1998* as new combinations: *Rhizobium radiobacter*, *R. rhizogenes*, *R. rubi*, *R. undicola* and *R. vitis*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 51. p. 89-103.
- ZALBA, S.M. & NEBBIA, A.J. (1999). *Neosparton darwinii* (Verbenaceae), a restricted endemic species. Is it also endangered? *Biodiversity and Conservation*, 8(12): 1585-1593.
- ZIEDAN, E.H.E. AND EL-MOHAMEDY, R.S.R. Application of *Pseudomonas fluorescens* for Controlling Root-rot Disease of Grapevine. *Research Journal of Agriculture and Biological Sciences*, 4(5): 346-353.